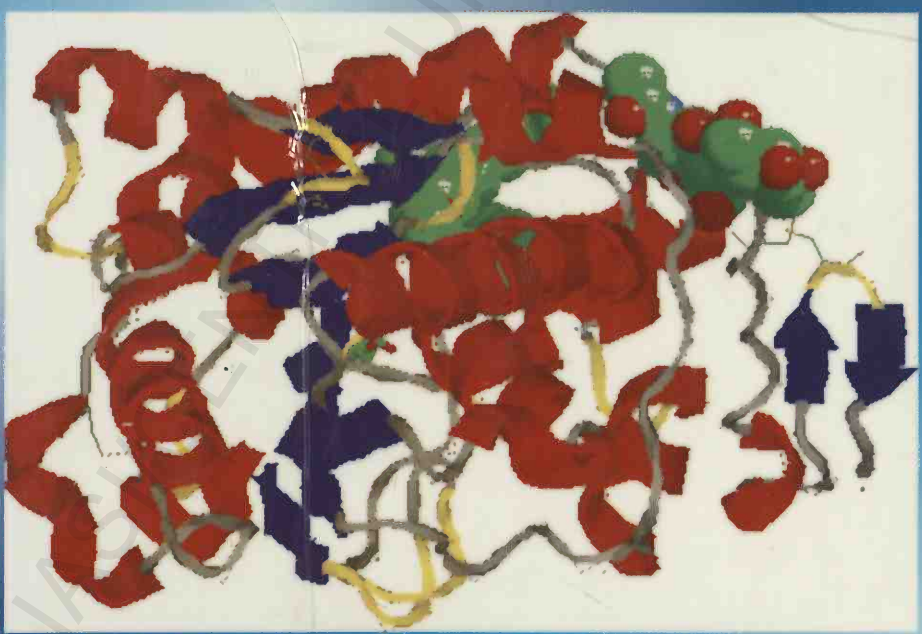
FRANCISC PÉTER

BIOTRANSFORMĂRI ENZIMATICE



П12.82.481

EDITURA POLITEHNICA

BCU TIMIȘOARA UNIVERSITY LIBRARY

BIBL. CENTR. UNIV.
„M. EMINESCU" IAŞI
III 282. 481

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Colecția "CHIMIE"

BIOTRANSFORMĂRI ENZIMATICE

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lucrarea abordează un domeniu extrem de dinamic şi modern al chimiei contemporane, utilizarea catalizatorilor biologici în sinteza chimică.

Cartea este deosebit de utilă în special chimiştilor organicieni care doresc să se familiarizeze cu acest domeniu şi să utilizeze biotransformările drept o viitoare metodologie pentru obţinerea de compuşi de mare valoare aplicativă. Ea se adresează în acelaşi timp studenţilor şi doctoranzilor de la facultăţile de chimie, biologie, farmacie, biotehnologie şi alte profile care fie au ca obiect de studiu şi biotransformările, fie doresc să-şi diversifice cunoştinţele prin abordarea acestui domeniu multidisciplinar de mare viitor.

Referent ştiinţific: Prof.dr.ing. Alfa Xenia LUPEA

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale a României
PÉTER, FRANCISC
Biotransformări enzimatice / dr.ing. Francisc Péter - Timişoara: Editura Politehnica, 2005
284 p. ; 24 cm. - (Chimie)
Bibliogr.
ISBN 973-625-212-4

577

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

396439

Dr.ing. Francisc Péter

BIOTRANSFORMĂRI ENZIMATICE

Colecţia "CHIMIE"

382815
B.C.U. IASI

ALE

EDITURA POLITEHNICA
TIMIŞOARA - 2005

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Copyright © Editura Politehnica, 2005

Toate drepturile sunt rezervate editurii. Nici o parte din această lucrare nu poate fi reprodusă, stocată sau transmisă prin indiferent ce formă, fără acordul prealabil scris al Editurii Politehnica.

EDITURA POLITEHNICA
Bv. Republicii nr. 9
300159 Timişoara, România

Tel. 0256/403.823
Fax: 0256/403.021

Consilier editorial: Prof. dr. ing. Sabin IONEL
Redactor: Claudia MIHALI

Bun de imprimat: 22.02.2005
Coli de tipar: 18
C.Z.U. 577
ISBN 973 - 625 - 212 - 4

Tiparul executat sub comanda nr. 14
la Centrul de Multiplicare al Universităţii "Politehnica" din Timişoara

12 AUG. 2005

BCU "ASIC CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

"Um ein Bild ze gebrauchen, will ich sagen, dass Enzym und Glucosid wie Schloss und Schlüssel zu einander passen müssen, um eine chemische Wirkung ausüben zu können".
E. Fischer, 1894

PREFAȚĂ

Dezvoltarea rapidă a biocatalizei şi utilizările sale tot mai numeroase în industria chimică, alimentară şi farmaceutică au determinat o extindere fără precedent a cercetărilor în acest domeniu. Aceasta a avut drept consecinţă creşterea interesului faţă de enzime şi în cadrul unor specialităţi care până acum le considerau doar nişte auxiliari importanţi ai proceselor biochimice.

Deşi în cărţile şi manualele de chimie şi biochimie există un material documentar bogat despre enzime, domeniul biocatalizei este mult mai puţin abordat. Literatura de specialitate din ţara noastră este destul de săracă în lucrări cu caracter monografic destinate celor care doresc să se familiarizeze cu biotransformările enzimatice, în special chimiştilor organicieni dispuşi să considere biocataliza mai mult decât o alternativă exotică a catalizei clasice. Cartea de faţă încearcă să fie un ghid util celor interesaţi de acest domeniu. În acest scop sunt prezentate principalele noţiuni legate de domeniul enzimologiei, apoi sunt evidenţiate caracteristicile imobilizării enzimelor şi utilizării lor în medii neapoase. Un capitol separat este dedicat lipazelor, enzimele cu cele mai multe aplicaţii existente şi de perspectivă în domeniul chimiei organice. Ultimul capitol sintetizează informaţiile disponibile despre utilizările industriale ale biocatalizatorilor enzimatici, confirmând deosebita dezvoltare a acestui domeniu mai ales în ultima perioadă.

Această carte se bazează pe experienţa acumulată în peste 20 de ani de activitate în domeniul biotransformărilor, desfăşurată în cadrul Colectivului de Biocataliză care a funcţionat între anii 1981-2000 integrat în cadrul Catedrei de Chimie Organică şi Tehnologii Organice de la Facultatea de Chimie Industrială şi Ingineria Mediului din Timişoara. Acest colectiv, înfiinţat de Prof. Dr. Radu Bacaloglu şi care a fost condus apoi de Prof. Dr. Carol Csunderlik, a avut rol de pionierat în dezvoltarea biocatalizei din ţara noastră şi a contribuit la formarea a numeroşi specialişti de valoare, dintre care majoritatea şi-au continuat activitatea în acelaşi domeniu la universităţi sau institute de specialitate din ţară sau străinătate.

Aş dori să mulţumesc pe această cale colegilor mei, foşti sau actuali, în special Drd. Ing. Kiss Claudia, Drd. Ing. Mirescu Agnes şi Drd. Ing. Szőcs-Bíró Emese pentru ajutorul acordat la sistematizarea documentaţiei şi alte aspecte legate de redactarea acestei cărţi. Prin tematică şi conţinut, lucrarea se doreşte a fi utilă mai ales studenţilor de la facultăţile de profil chimic, biochimic sau alimentar care au ca obiect de studiu şi biotransformările, dar în acelaşi timp tuturor celor care doresc să se iniţieze în acest domeniu interdisciplinar de mare frumuseţe şi complexitate.

Timişoara, februarie 2005

Autorul

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

1.	**INTRODUCERE**	11
2.	**NOȚIUNI GENERALE DESPRE ENZIME**	15
2.1.	Nomenclatura, clasificarea și codificarea enzimelor	15
2.2.	Structura enzimelor	18
2.2.1.	Structura primară	19
2.2.2.	Structura secundară	21
2.2.3.	Structura terțiară	24
2.2.4.	Structura cuaternară	25
2.3.	Cofactori	26
2.4.	Specificitatea enzimelor	26
2.5.	Cinetica reacțiilor enzimatice	28
2.6.	Inhibiția reacțiilor enzimatice	33
2.7.	Exprimarea activității enzimelor	35
3.	**IMOBILIZAREA ENZIMELOR**	37
3.1.	Considerații generale	37
3.2.	Suporturi pentru imobilizarea enzimelor	40
3.2.1.	Suporturi organice	41
3.2.1.1	Suporturi naturale	42
3.2.1.2.	Suporturi sintetice polimere	44
3.2.2.	Suporturi anorganice	45
3.3.	Metode de imobilizare	47
3.3.1.	Imobilizarea prin legare de suport	48
3.3.1.1.	Adsorbția fizică	49
3.3.1.2.	Legarea ionică	52
3.3.1.3.	Legarea covalentă	54
3.3.2.	Imobilizarea prin înrețelarea enzimei. Cristale înrețelate.	68
3.3.3.	Imobilizarea prin incluziune (entrapare)	70
3.3.3.1.	Entraparea în geluri organice	71

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3.3.3.2.	Entraparea în silicageluri	77
3.3.3.3.	Entraparea în fibre	84
3.3.3.4.	Imobilizarea prin microincapsulare	84
3.3.4.	Evaluarea comparativă a tehnicilor de imobilizare	89
3.4.	Efectul imobilizării asupra proprietăților enzimelor	90
3.4.1.	Influența asupra specificității de substrat	90
3.4.2.	Influența asupra pH-ului optim de acțiune al enzimei	91
3.4.3.	Influența asupra temperaturii optime a enzimei	91
3.4.4.	Efectul asupra parametrilor cinetici	91
3.4.5.	Efectul asupra stabilității enzimelor	92
4.	**REACȚII ENZIMATICE ÎN SOLVENȚI ORGANICI**	**95**
4.1	Principii de bază	95
4.1.1.	Alegerea solventului	96
4.1.2.	Tipuri de preparate enzimatice solide	98
4.1.3.	Medii de reacție neconvenționale	101
4.2.	Parametrii care influențează activitatea enzimelor în medii neapoase	102
4.2.1.	Efectul apei	102
4.2.2.	Efectul solventului	106
4.3	Influența mediului organic asupra proprietăților enzimelor	108
4.3.1.	Specificitatea enzimelor în medii neapoase	108
4.3.2.	Stabilitatea termică a enzimelor în medii neapoase	112
5.	**BIOCATALIZĂ CU LIPAZE**	**114**
5.1.	Obținerea, purificarea și caracterizarea lipazelor	115
5.1.1.	Obținerea și purificarea lipazelor din culturi microbiene	115
5.1.1.1.	Culturi pe medii solide	116
5.1.1.2.	Culturi submerse	116
5.1.1.3.	Purificarea și caracterizarea lipazelor microbiene	122
5.1.2.	Obținerea, purificarea și caracterizarea lipazelor pancreatice	128
5.1.3.	Structura lipazei și conformația centrului activ	132

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B.C.U. "M. EMINESCU" IAŞI

5.1.4.	Specificitatea lipazelor	136
5.2.	Cinetica şi mecanismul reacţiilor catalizate de lipaze	138
5.2.1.	Cinetica hidrolizei trigliceridelor emulsionate	139
5.2.2.	Cinetica hidrolizei enzimatice cu lipaze în sisteme bifazice apă-solvenţi organici	146
5.2.3.	Cinetica reacţiilor de esterificare şi transesterificare în solvenţi organici, catalizate de lipaze	151
5.2.4.	Mecanismul catalitic al reacţiilor catalizate de lipaze	159
5.3.	Utilizarea lipazelor drept biocatalizatori în sinteze organice	162
5.3.1.	Reacţii de hidroliză catalizate de lipaze	163
5.3.1.1.	Hidroliza trigliceridelor	164
5.3.1.2.	Reacţii de hidroliză enantioselectivă	168
5.3.2.	Reacţii de esterificare şi transesterificare	176
5.3.2.1.	Sinteze de esteri prin reacţii de esterificare directă	176
5.3.2.2.	Acilări şi transesterificări enantioselective	190
5.3.2.3.	Modificarea trigliceridelor prin trans- şi interesterificare	198
6.	**APLICAŢII INDUSTRIALE ALE ENZIMELOR**	**204**
6.1.	Realizări şi tendinţe în biocataliza industrială	208
6.2.	Reacţii catalizate de oxidoreductaze	216
6.2.1.	Oxidarea D-sorbitolului la L-sorboză	216
6.2.2.	Aminarea reductivă enantioselectivă a α-cetoacizilor la L-aminoacizi	217
6.2.3.	Reacţii de hidroxilare regioselective ale compuşilor aromatici	218
6.2.4.	Alcooli chirali prin reducerea enantioselectivă a cetonelor	221
6.2.6.	Bioconversia cicloalcanonelor	224
6.2.7.	Oxidarea n-alcanilor la alcooli primari	225
6.3.	Reacţii catalizate de transferaze	225
6.3.1.	Fosforilarea regioselectivă	225
6.3.2.	Procese de transaminare	226
6.4.	Reacţii catalizate de hidrolaze	227
6.4.1.	Obţinerea aminoacizilor optic activi	228

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6.4.2.	Obținerea unor antibiotice semisintetice cu penicilin acilază	236
6.4.3.	Reacții de hidroliză și acilare enantioselectivă prin rezoluții cinetice catalizate de lipaze	238
6.4.4.	Reacții de asimetrizare catalizate de lipaze	243
6.4.5.	Obținerea unor gliceride modificate cu lipaze	244
6.4.6.	Utilizarea lipazelor pentru fabricarea esterilor aromatizanți	246
6.4.7.	Utilizarea biocatalitică a proteazelor	246
6.4.8.	Obținerea L-lizinei din D,L-α-amino-ε-caprolactamă	248
6.4.9.	Hidroliza nitrililor	248
6.5.	Reacții catalizate de liaze	249
6.5.1.	Hidratarea biocatalitică a nitrililor	249
6.5.2.	Reacții de sinteză asimetrică realizate cu liaze	252
6.5.3.	Sinteza acidului N-acetil-D-neuraminic	257
6.6.	Reacții catalizate de izomeraze	258
6.7.	Reacții catalizate de ligaze	261
6.8.	Biotransformări complexe realizate cu microorganisme modificate genetic	261
6.9.	Perspectivele biocatalizei industriale	262
	BIBLIOGRAFIE	**264**

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1. INTRODUCERE

Biotransformările enzimatice au la bază utilizarea capacității catalitice a enzimelor şi pot fi incluse în ramura biotehnologiilor. Biotehnologia poate fi definită ca un domeniu multidisciplinar care utilizează potențialul microorganismelor şi al altor organisme pentru obținerea unor bunuri industriale, alimentare, agricole, obținerea de energie sau protecția mediului. Utilizarea deliberată a unor reacții catalizate de enzime reprezintă esența oricărei biotehnologii, de la cele mai simple care cuprind transformări biochimice sub acțiunea unei singure enzime până la cele complexe care includ o multitudine de etape de transformare. Termenul de biotehnologie a fost folosit pentru prima oară în Yorkshire, Anglia, la începutul secolului XX (Hulse, 2004).

Principiile de bază ale biocatalizei şi raționea utilizării sale în chimia organică şi tehnologia chimică organică nu sunt noi, ele regăsindu-se deja în cercetările lui Pasteur din a doua jumătate a secolului al XIX-lea. El a demonstrat că obținerea unui izomer optic activ pornindu-se de la amestecul racemic este posibilă prin utilizarea unui microorganism care degradează doar un singur enantiomer, lăsându-l pe celălalt nemodificat. Această descoperire a avut un impact important asupra chimiştilor din epoca respectivă şi utilizarea microorganismelor în sinteza organică era considerată de mulți un lucru mai puțin neobişnuit decât apare el pentru o serie dintre chimiştii de astăzi. În jurul anului 1900 a fost descoperit şi un alt aspect al biocatalizei, a cărui importanță a fost recunoscută doar în ultimii ani. Este vorba de faptul că acțiunea catalitică a enzimelor hidrolitice este reversibilă, în sensul că ele pot cataliza şi reacțiile inverse. Pottevin a demonstrat deja în 1906 că preparatul brut de lipază pancreatică duce la obținerea oleatului de metil din metanol şi acid oleic într-un mediu de reacție în mare parte de natură organică. Evident însă că în acea perioadă proceselor biocatalitice nu li se acorda importanța tehnologică cuvenită, întrucât se ştia doar foarte puțin despre felul în care se desfăşoară aceste procese. Cu toate acestea, se poate afirma faptul că industria chimică a beneficiat încă din secolul XIX de rezultatele dezvoltării biotehnologiei, bazate mai ales pe lucrările lui Pasteur. Este vorba despre realizarea unor procese fermentative la scară industrială, care au asigurat pentru industria chimică alcool etilic, iar mai târziu, în jurul anului 1920, hidroxiacizi (acid lactic, acid citric), solvenți (acetonă, butanol) şi glicerină. Aproximativ în acelaşi timp a inceput utilizarea unor enzime de tipul amilazelor şi proteazelor în industria berii şi industria textilă.

Biotransformările în chimia organică reprezintă aplicații de dată mai recentă ai catalizatorilor biologici, care se adaugă la o serie de alte utilizări binecunoscute ca fabricarea şi conservarea produselor alimentare şi băuturilor, finisarea şi spălarea textilelor, obținerea unor reactivi şi senzori specifici pentru analizele clinice şi altele. Biocatalizatorii pot fi folosiți în chimia organică fie pentru sinteza unor compuşi care sunt intermediari în fabricarea unor produse chimice, fie pentru obținerea produselor finite ca atare. În aceste situații vorbim despre metode chimico-enzimatice, respectiv enzimatice de sinteză ale compuşilor organici. Majoritatea lor au drept scop obținerea de compuşi chirali conținând grupări funcționale specifice, care fac parte din categoria compuşilor organici de sinteză fină.

Distincția între procesele fermentative clasice și cele biocatalitice nu este ușoară de realizat, deși ele au anumite caracteristici particulare.

Procesele fermentative clasice constau în cultivarea unor microorganisme care pot fi bacterii, drojdii sau ciuperci, pe medii nutritive potrivite care reprezintă substratul pentru metabolismul lor. Substrat este denumit reactantul a cărui transformare chimică este catalizată de enzimă. În funcție de scopul urmărit, avem patru tipuri de asemenea procese (Stanbury și Whitaker, 1984):

1. Procese care produc celule microbiene sau biomasă.
2. Procese care produc enzime microbiene.
3. Procese în care se obțin metaboliți de natură microbiană.
4. Procese de transformare, care realizează modificarea unui compus chimic introdus în mediul de cultură.

Trebuie remarcat că, în toate aceste procese, se produce într-o primă fază dezvoltarea microorganismului respectiv pe substratul organic abia după aceea având loc conversia propriu-zisă a acestuia și că procesul este realizat cu ajutorul celulelor vii de microorganisme. Exemplul clasic este fermentația glucozei la alcool etilic cu *Saccharomyces cerevisiae*. O altă caracteristică a proceselor fermentative este aceea că în general există mai multe etape catalitice între substrat și produs și, în mod corespunzător, mai multe enzime implicate în realizarea acestora. Acest tip de procese prezintă însă și două dezavantaje importante:

- Procesul este însoțit în toate cazurile de obținerea unor cantități însemnate de biomasă și drept urmare concentrația produsului util în mediul de fermentație este redusă, iar separarea ei este dificilă și costisitoare.
- În general microorganismele produc o diversitate mare de enzime, chiar în condiții de cultură controlate, ceea ce poate duce la apariția unor produse secundare nedorite.

Biotransformările enzimatice și ***procesele biocatalitice*** pot fi considerate derivate din cea de-a patra categorie de procese fermentative, întrucât ele realizează transformarea chimică a unor compuși utilizând potențialul biocatalitic al enzimelor și de multe ori aceste enzime sunt produse (intracelular sau extracelular) prin cultivarea microorganismelor chiar pe substratul a cărei transformare o realizează. Un exemplu în acest sens este oxidarea stereoselctivă a D-sorbitolului la L-sorboză sub acțiunea microorganismului *Acetobacter suboxidans*, care este una dintre etapele fabricării vitaminei C.

Apar însă și o serie de aspecte specifice, care diferențiază procesele de biotransformări de biotehnologiile fermentative clasice.

- biotransformările enzimatice implică un număr mai redus de etape, în mod uzual una singură și din acest motiv structura reactantului și cea a produsului de reacție sunt asemănătoare, modificarea având loc la nivelul unei singure grupări funcționale, ca la cataliza chimică obișnuită.

- pentru realizarea biotransformărilor se utilizează nu numai enzime produse de microorganisme ci şi enzime de origine vegetală sau animală.
- biotransformările enzimatice nu mai prezintă inconvenientele majore legate de realizarea unor reacţii de transformare chimică a unor compuşi direct în mediul de cultură.
- în cazul în care biotransformarea este realizată cu celule intregi, acestea nu mai sunt capabile de creştere şi înmulţire.

Termenii de biotransformare şi biocataliză nu sunt sinonime, deşi de referă la acelaşi tip de procese. În general ca biotransformări sunt desemnate toate procesele în care sunt implicate enzime sau celule întregi neviabile, iar ca biocataliză sunt denumite acele biotransformări care se realizează cu preparate enzimatice nepurificate sau cu enzime purificate (Bommarius şi Riebel, 2004).

Procesele biocatalitice sunt definite drept acele procese care realizează transformarea unui substrat dat într-un produs definit, utilizând una sau mai multe etape catalizate de enzime. Ele s-au dezvoltat pe o direcţie proprie, care a constat în folosirea ca biocatalizatori a enzimelor izolate, cu un grad de puritate mai mult sau mai puţin avansat.

Varianta ideală de biocataliză ar fi aceea în care mediul de reacţie să fie eterogen, astfel ca enzima să reprezinte o fază distinctă, preferabil solidă. În aceste condiţii enzima va putea fi separată uşor şi reutilizată, reducându-se costurile de producţie şi se va evita contaminarea produşilor de reacţie cu proteină enzimatică. Încercările de realizare practică a acestui deziderat au dus la elaborarea a trei sisteme de reacţie enzimatice eterogene:

(a) *Sisteme de reacţie bifazice,* în care substratul insolubil în apă este dizolvat într-un solvent organic nemiscibil cu apa sau constituie el însuşi faza organică, în timp ce enzima se găseşte dizolvată în faza apoasă.

(b) *Sisteme de reacţie în solvenţi organici,* în care nu mai există o fază apoasă şi enzima este suspendată în mediul organic nemiscibil cu apa. S-a demonstrat că, deşi apa este indispensabilă pentru menţinerea conformaţiei catalitice active a enzimelor, cantitatea de apă necesară acestui scop este foarte mică. Astfel, lipaza pancreatică îşi menţine activitatea la o concentraţie de apă de numai 0,015% în mediul de reacţie, ceea ce înseamnă că poate funcţiona în condiţii practic anhidre.

(c) *Sisteme de reacţie cu enzime imobilizate,* în majoritatea cazurilor pe suporturi solide, care pot funcţiona atât în mediu apos cât şi în mediu de solvenţi organici.

Cele mai multe aplicaţii ale biocatalizei sunt în industria alimentară şi cea farmaceutică. Procesele din industria alimentară sunt relativ simple şi unele dintre ele datează cu mult dinainte de a se fi stabilit natura lor enzimatică, de exemplu coagularea laptelui pentru fabricarea brânzeturilor. Industria farmaceutică a avut în schimb avantajul că era familiarizată cu tehnologiile fermentative, chiar dacă procesarea produselor rezultate din fermentaţie se făcea exclusiv pe cale chimică. Primul mare succes la înlocuirea unei tehnologii chimice cu una enzimatică s-a înregistrat la

fabricarea acidului 6-aminopenicilanic. Este vorba despre reacția de hidroliză enzimatică a catenei laterale a penicilinei G obținute prin fermentație, utilizând enzima penicilinacilază. În deceniul 8 al secolului XX a existat o competiție între procedeul chimic și cel enzimatic, care a fost câștigată de procedeul enzimatic în momentul când au fost eliminate problemele care în prima fază făceau tehnologia enzimatică necompetitivă: activitatea redusă a catalizatorului enzimatic, costul său ridicat sau chiar anumite reținere față de tehnologiile de acest tip. Alte procese care au apărut ulterior se bazează în majoritatea lor pe obținerea unor compuși optic activi cu valoare ridicată și a căror sinteză pe cale chimică este adeseori dificilă, deși progresele obținute în ultimii ani în domeniul sintezelor asimetrice, de exemplu, sunt remarcabile.

Se poate afirma că la ora actuală nu mai există bariere tehnologice în calea proceselor biocatalitice industriale. Deși procesele operate la tonaj mare sunt asociate mai ales industriei alimentare, există o serie de alte procese biocatalitice la care s-a ajuns la o producție mondială anuală de peste 1000 de tone, fără a lua în considerare enzimele care sunt comercializate ca parte componentă a unor produse cum ar fi detergenții. În realitate, enzimele produse și vândute în cea mai mare cantitate sunt protează alcaline microbiene care intră în compoziția detergenților.

În viitorul apropiat sunt șanse puține ca biocataliza să poată înlocui catalizatorii clasici în tehnologiile chimice de bază, deși în principiu pentru fiecare asemenea proces există un biocatalizator corespunzător. În procesele de sinteză organică fină însă competiția este deschisă. Progresele înregistrate în ultima vreme în domeniul ingineriei genetice, biologiei moleculare și bioingineriei au făcut posibilă obținerea unor biocatalizatori mai ieftini, mai productivi și mai rezistenți, care pot fi asimilați relativ simplu chiar în cadrul unor tehnologii existente. Astfel, s-a realizat selecția unor microorganisme care produc aceleași enzime ca înainte dar cu spectru de activitate mai larg, optimizarea acestei activități prin mutageneză selectivă, transferul genei corespunzătoare într-un microorganism cu mare productivitate și nepatogen, sau chiar încorporarea unui promotor specific în genă. La toate acestea s-au adăugat progresele înregistrate în domeniul imobilizării enzimelor, determinând în cele din urmă apariția pe piață a unor enzime comerciale cu performanțe superioare. Decizia finală va fi luată, pentru fiecare caz în parte, pe baza indicatorilor de eficiență economică.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. NOȚIUNI GENERALE DESPRE ENZIME

Enzimele reprezintă biocatalizatori de natură proteică specifici reacțiilor chimice care au loc în organismele vii. Dezvoltarea puternică a enzimologiei este legată de perioada ultimelor decenii, deşi prima descoperire a unei enzime a fost realizată de Payen şi Persoz, care în 1833 au reuşit separarea dintr-un extras apos de malț a unei enzime ce scindează amidonul la zaharuri inferioare, iar în final la glucoză, enzimă ce astăzi este denumită amilază (Payen şi Persoz, 1833). În 1834 Schwann a reuşit să izoleze o altă enzimă, pepsina, prin extracție în mediu acid din peretele stomacal. Denumite la început fermenți, de la cuvântul latin *ferveo* (a fierbe) din cauza fierberii aparente ce însoțește procesele de fermentație dar care este produsă în realitate de eliminarea unor substanțe gazoase, enzimele au constituit subiectul a numeroase dispute ştiințifice referitoare la legătura dintre biocatalizatori şi forțele vitale (*vis vitalis*). Şcoala lui Pasteur avea ferma convingere că fermentația alcoolică nu poate avea loc fără prezența unui organism viabil, în timp ce o altă şcoală, reprezentată de marii chimişti Liebig şi Wöhler, considera că fermentația este rezultatul unui proces chimic obişnuit. În cele din urmă s-a demonstrat că procesele complexe de biotransformare nu sunt produse de organismele vii ci de anumiți compuşi chimici din compoziția lor, idee care de fapt fusese enunțată încă din 1836 de Berzelius (Nielsen ş.a., 1994). Denumirea de enzimă a fost introdusă în 1878 de Kühne, însemnând în limba greacă "în drojdie". Cele două denumiri enzimă şi ferment sunt astăzi sinonime, primul fiind însă utilizat aproape în exclusivitate (Dumitru şi Iordăchescu, 1981).

2.1. Nomenclatura, clasificarea şi codificarea enzimelor

Încă de la începutul enzimologiei ca ştiință a apărut necesitatea denumirii şi clasificării enzimelor pe baza reacțiilor pe care acestea le catalizează. Astfel, enzimelor care catalizează acelaşi tip de reacție li s-au atribuit denumiri de grup, de exemplu "proteaze" sau "proteinaze" pentru enzimele care hidrolizează legăturile peptidice. Deşi aceste denumiri comune sunt mult utilizate şi astăzi, odată cu descoperirea unui număr din ce în ce mai mare de enzime a devenit necesară adoptarea unui sistem de clasificare numerică şi a unei nomenclaturi pe baze ştiințifice, pentru evitarea confuziilor. Această sarcină a revenit Comisiei de Enzimologie a Uniunii Internaționale de Biochimie, care în 1964 a elaborat clasificarea ce este valabilă şi astăzi. Rolul Comisiei de Enzimologie a fost legat nu numai de nomenclatura enzimelor ci şi de stabilirea simbolurilor matematice pentru studiile de cinetică enzimatică şi standardizarea unităților de exprimare a activității enzimatice. Începând din anul 1977, problemele de nomenclatură ale enzimelor au trecut în sarcina Comisiei de Nomenclatură a Uniunii Internaționale de Biochimie (NC-IUB), care mai târziu a devenit Uniunea Internațională de Biochimie şi Biologie Moleculară (IUBMB).

Nomeclatura NC-IUBMB se bazează pe tipul de reacție pe care enzima îl catalizează, împărțind enzimele în șase mari clase (IUPAC/IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1972):

1. Oxidoreductaze
2. Transferaze
3. Hidrolaze
4. Liaze
5. Izomeraze
6. Ligaze sau sintetaze

După cum le indică și numele, *oxidoreductazele* sunt enzime care catalizează diverse reacții redox, *transferazele* catalizează reacții de transfer a unor grupări chimice de la o moleculă la alta, *hidrolazele* realizează scindarea hidrolitică a unor legături sau grupări, *liazele* catalizează reacții de eliminare sau de adiție a unor grupări din sau la molecula substratului fără participarea apei, cu formarea unei duble legături sau la nivelul dublei legături în cazul reacțiilor de adiție, *izomerazele* catalizează diverse reacții de izomerizare (D-L, *cis-trans* etc.), iar *ligazele* sau *sintetazele* catalizează reacții de sinteză prin condensarea a două molecule, cuplate cu scindarea unei legături pirofosforice din ATP sau dintr-un nucleozid trifosfat similar. Deoarece are la bază tipul de reacție pe care îl catalizează o anumită enzimă, această clasificare are un caracter funcțional și nu structural.

Enzimele reunite într-o anumită clasă sunt ulterior clasificate în subclase, și sub-subclase în funcție de unele detalii privind grupările chimice asupra cărora acționează, cofactorii implicați în reacția respectivă, etc. De asemenea, fiecare enzimă este caracterizată printr-un *cod* format din patru cifre, EC *A.B.C.D.*, care conține informații despre enzima respectivă (EC indică faptul că este vorba de clasificarea conform normativelor fostei Comisii de Enzimologie).

A. indică apartenența la una din cele șase mari clase de enzime.

B. indică apartenența la o subclasă, conform naturii chimice a legăturii scindate, așa cum este prezentat în Tabelul 2.1 pentru clasa hidrolazelor (Copeland, 1996).

C. indică apartenența la o sub-subclasă, conform naturii chimice a substratului transformat. Un exemplu in acest sens este prezentat în Tabelul 2.2 pentru enzimele din subclasa ester hidrolazelor. În mod excepțional, în cazul peptidil-peptid hidrolazelor a treia cifră este bazată pe mecanismul catalitic, după cum indică studiile asupra centrului activ și ale efectului pH.

D. este un număr specific fiecărei enzime. De exemplu, lipaza are codul 3.1.1.3. care simbolizează faptul că este vorba despre o hidrolază care acționează asupra legăturii esterice și hidrolizează anumiți esteri de acizi carboxilici. Ultima cifră arată că este vorba despre ce-a de-a treia enzimă clasificată în sub-subclasa carboxil ester hidrolazelor. În cadrul unor subclase și sub-subclase s-a prevăzut și o

subdiviziune notată cu cifra 99 în care să fie încadrate enzimele noi descoperite, până când descoperirea lor este recunoscută oficial și ele primesc codificarea definitivă.

Tabelul 2.1. Subclasificarea hidrolazelor (EC 3.x.x.x.), conform NC-IUBMB.

Codificarea subclasei	Substratul enzimei*
3.1.	Esteri –C(O)–O····R, sau conținând S sau P în loc de C, sau –C(O)–S····R
3.2.	Glicozil, zaharuri –C–O····R, sau conținând N sau S în loc de O
3.3	Eteri –R–O····R, sau conținând S în loc de O
3.4.	Peptide C····N
3.5	Nonpeptide cu legături C····N
3.6.	Anhidride acide R–C(O)–O····C(O)–R
3.7.	Compuși cu legături C····C
3.8.	Halogenuri (X) C····X sau conținând P în loc de C
3.9.	Compuși cu legături P····N
3.10.	Compuși cu legături S····N
3.11.	Compuși cu legături C····P

*cu linie punctată a fost marcată legătura care este hidrolizată de enzimă

Tabelul 2.2. Subclasificarea ester-hidrolazelor (EC 3.1.x.x.), conform NC-IUBMB

Codificarea sub-subclasei	Denumirea sub-subclasei
3.1.1.	Carboxil ester hidrolaze
3.1.2.	Tiolester hidrolaze
3.1.3.	Monoester fosforic hidrolaze
3.1.4.	Diester fosforic hidrolaze
3.1.5.	Monoester trifosforic hidrolaze
3.1.6.	Ester sulfuric hidrolaze
3.1.7.	Monoester difosforic hidrolaze

Denumirea oficială, codificarea și principalele caracteristici ale tuturor enzimelor cunoscute la această oră pot fi găsite pe adresa de Internet a Comisiei de Nomenclatură din cadrul Uniunii Internaționale de Biochimie și Biologie Moleculară (NC-IUBMB) *www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme*.

În ce privește denumirea sistematică a enzimelor, aceasta este formată din două părți:

- prima parte a denumirii este derivată de la numele substratului (sau substraturilor, separate prin două puncte verticale în cazul reacțiilor

bimoleculare). Denumirea substratului trebuie să fie conformă cu nomenclatura Uniunii Internaţionale de Chimie Pură şi Aplicată (IUPAC);

- cea de-a doua parte a denumirii indică natura reacţiei catalizate de enzima respectivă, la care se adaugă sufixul *ază*.

Revenind la exemplu lipazei, denumirea sistematică a acestei enzime este *triacilglicerol acilhidrolază*, adică ea are ca substrat triacil-gliceridele şi acţionează asupra lor prin hidroliza unei grupări acil. De foarte multe ori, aceste denumiri sistematice sunt foarte lungi şi nepractice de folosit. Din acest motiv se folosesc în mod curent vechile denumiri comune (cum ar fi lipază, protează, etc.) atunci când ele nu dau naştere la confuzii, dar şi o serie de denumiri de lucru în care se renunţă la denumirea substratului conform nomenclaturii IUPAC şi apar cuvinte speciale ca decarboxilază, dehidrogenază, etc. De exemplu, se foloseşte aldoză reductază în loc de alditol:NAD(P)$^+$ 1-oxidoreductază pentru enzima cu codul EC 1.1.1.21. sau glutamat decarboxilază în loc de L-glutamat 1-carboxi-liază pentru enzima cu codul EC 4.1.1.15.

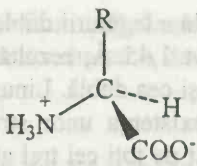
Lista enzimelor cunoscute creşte permanent, ea fiind periodic revizuită şi republicată. Dacă în 1920 nu erau cunoscute decât 10-15 enzime, ultima ediţie (suplimentul 5) cuprinde un număr de 3196 de enzime (NC-IUBMB, 1999).

2.2. Structura enzimelor

Natura chimică a enzimelor a fost multă vreme necunoscută. Prima enzimă obţinută în stare cristalizată a fost ureaza, stabilindu-se totodată şi natura proteică a acesteia (Sumner, 1926). Cu toate acestea, o serie de cercetători au continuat să conteste natura proteică a enzimelor până când s-a reuşit obţinerea în stare pură şi cristalizată a sute de enzime care s-au dovedit a fi, fără excepţie, proteine.

Proteinele au ca structură de bază o catenă polipeptidică constituită din resturi de aminoacizi. Enzimele pot fi alcătuite numai din catene polipeptidice, fiind proteine simple sau holoproteine, sau pot avea două componente, una de natură proteică şi una neproteică, fiind heteroproteine. Partea neproteică poate fi o coenzimă, dacă ea se leagă de partea proteică prin legături necovalente, sau o grupare prostetică, atunci cînd este legată prin legături de tip covalent (ex: vitamine hidrosolubile, nucleotide, ioni metalici). Partea proteică, numită apoenzimă, poate fi constituită din una sau mai multe catene polipetidice. Aceste catene prezintă o serie de plieri, care realizează anumite conformaţii spaţiale având drept rezultat formarea aşa-numitului "centru activ" în care are loc procesul catalitic. În cazul enzimelor care sunt holoproteine, centrul activ este alcătuit numai din resturi de aminoacizi, care pot fi situaţi în poziţii diferite ale catenei polipeptidice, însă sunt apropiate ca poziţie spaţială şi grupate pe o arie cu un diametru de aproximativ 15-20 Å. În cazul enzimelor care sunt heteroproteine, în structura centrului activ poate intra şi componenta neproteică.

Unitatea structurală de bază a enzimelor, ca de altfel a oricărei proteine, o constituie aminoacizii. Structura generală a unui aminoacid poate fi scrisă sub forma:



Ei conţin un atom de carbon central (aşa-numitul α-atom), de care sunt legate o grupare amino, o grupare carboxil, un atom de hidrogen şi o catenă laterală R. Există 20 de grupări R diferite care se întâlnesc în proteine şi care diferă între ele ca mărime, polaritate şi proprietăţi acido-bazice. Cea mai simplă variantă, în care gruparea R este un atom de hidrogen, o întâlnim în cazul glicinei. Toţi ceilalţi aminoacizi sunt optic activi şi aparţin seriei sterice L, raportat la configuraţia L-gliceralaldehidei.

Organizarea structurală a enzimelor, la fel ca în cazul celorlalte proteine, cuprinde patru nivele: structura primară, secundară, terţiară şi cuaternară.

2.2.1. Structura primară

Structura primară este reprezentată de secvenţa (numărul şi succesiunea) aminoacizilor şi nu înglobează aranjamente spaţiale, cu excepţia configuraţiei α-atomului de carbon. Din considerente practice, α-aminoacizii din structura primară a moleculelor proteice sunt simbolizaţi cu denumiri codificate, de exemplu *Ser* pentru serină, *Met* pentru metionină, *Thr* pentru treonină, etc. Ca structură primară, enzimele sunt nişte polipeptide rezultate prin policondensarea aminoacizilor care intră în componenţa lor. Succesiunea aminoacizilor în aceste catene polipeptidice este reglată de aparatul genetic al celulei. De aceea, aceeaşi enzimă provenită din surse diferite nu va avea obligatoriu aceeaşi structură primară, însă ele vor fi asemănătoare. Studiile prin cristalografie de raze X aplicate unor polipeptide cristalizate au stabilit că lungimea legăturii carbon-oxigen este de 1,24 Å, iar cea a legăturii carbon-azot este de 1,32 Å, aşa cum este prezentat şi în Figura 2.1 (Copeland, 1996).

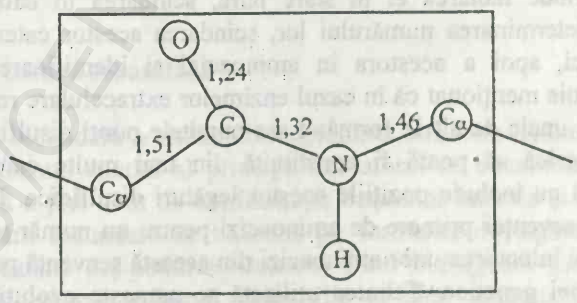


Figura 2.1. Schema legăturii peptidice. Cifrele reprezintă lungimea legăturii, în Å.

Deoarece lungimea normală a legăturii duble carbon-oxigen este de 1,22 Å iar cea a legăturii simple carbon azot 1,45 Å, rezultă că ambele legături sunt de fapt intermediare între legătura simplă şi cea dublă. Linus Pauling a fost cel care a explicat această aparentă anomalie prin existenţa unor structuri de rezonanţă, sistemul de electroni π fiind de fapt delocalizat pe toţi cei trei atomi O—C—N. Se poate afirma că legătura peptidică are în proporţie de 60% caracter C=O şi în proporţie de 40% caracter C=N. Caracterul de 40% legătură dublă a legăturii carbon-azot din scheletul principal al lanţului polipeptidic înseamnă o stabilitate mai mare datorită unei energii de rezonanţă cu 20 kcal/mol mai mici şi o împiedicare semnificativă a liberei rotaţii în jurul acestei legături. Drept urmare, cei şase atomi ai unei unităţi peptidice vor trebui să se găsească în acelaşi plan, ceea ce limitează configuraţiile posibile pe care catena polipeptidică le poate adopta. O altă consecinţă a acestei planarităţi este existenţa a doi izomeri: *cis*, în care atomul de oxigen carbonilic şi atomul de hidrogen legat de azot se găsesc de aceeaşi parte a axei legăturii C—N şi *trans*, în care se găsesc de o parte şi de alta a acestei axe. Din considerente termodinamice, practic toate legăturile peptidice care se întâlnesc în enzime se găsesc în configuraţie *trans*. Excepţie fac legăturile prolil-peptidice, care se întâlnesc în puţine cazuri şi în configuraţie *cis*, de exemplu în subtilizină legătura dinaintea restului Pro 168.

Catena polipeptidică rezultată din policondensarea aminoacizilor din componenţa unei enzime va fi polară la cele două capete, la un capăt având o grupare aminică încărcată pozitiv, acesta fiind denumit capătul N-terminal, iar la celălalt capăt va avea o grupare carboxilică încărcată negativ, acesta fiind capătul C-terminal. Resturile de aminoacizi din componenţa moleculei proteice se numerotează în ordine, începând de la capătul N-terminal. Astfel, o referire la "restul activ Ser 152" din lipaza pancreatică înseamnă că este vorba de cel de-al 152-lea aminoacid din structura primară a enzimei respective, care face parte din structura centrului activ.

De exemplu, secvenţa primară de aminoacizi a enzimei papaină (o protează de natură vegetală, Figura 2.2) cuprinde 212 resturi de aminoacizi (Dumitru şi Iordăchescu, 1981).

Elucidarea structurii primare a unei enzime este un procedeu extrem de laborios ce cuprinde izolarea ei în stare pură, scindarea în catenele polipetidice componente şi determinarea numărului lor, scindarea acestor catenelor peptidice în peptide mai mici, apoi a acestora în aminoacizi şi identificarea tuturor acestor aminoacizi. Trebuie menţionat că în cazul enzimelor extracelulare resturile de cisteină se leagă adeseori unele de altele formând aşa-numitele punţi disulfidice, ceea ce face ca molecula proteică să poată fi constituită din mai multe catene polipeptidice. Structura primară nu include poziţiile acestor legături disulfidice. La ora actuală s-a reuşit stabilirea secvenţei primare de aminoacizi pentru un număr mare de enzime şi chiar este posibilă înlocuirea unor aminoacizi din această secvenţă prin altele, folosind metodele ingineriei genetice. Tehnica utilizată se numeşte evoluţie direcţionată. În acest mod s-au obţinut enzime noi, modificate genetic, care pot avea proprietăţi superioare enzimei native (Soumillion şi Fastrez, 2001). O altă posibilitate este încorporarea unui rest de aminoacid într-o anumită poziţie din molecula enzimei prin

mutageneză direcționată, care poate fi urmată de modificarea chimică a catenei laterale a aminoacidului respectiv. Și această tehnică a dat o serie de rezultate spectaculoase (DeSantis și Jones, 1999).

H_2N-Ile-Pro-Glu-Tyr-Val-Asp-Trp-Arg-Gln-Lys-Gly-Ala-Val-Thr-Pro-
1 5 10 15
Val-Lys-Asn-Gln-Gly-Ser-Cys-Gly-Ser-Cys-Trp-Ala-Phe-Ser-Ala-Val-
20 25 30
Val-Thr-Ile-Glu-Gly-Ile-Ile-Lys-Ile-Arg-Thr-Gly-Asn-Leu-Asn-Gln-
35 40 45
Tyr-Ser-Glu-Gln-Glu-Leu-Leu-Asp-Cys-Asp-Arg-Arg-Ser-Tyr-Gly-Cys-
50 55 60
Asn-Gly-Gly-Tyr-Pro-Trp-Ser-Ala-Leu-Gln-Leu-Val-Ala-Gln-Tyr-Gly-
65 70 75
Ile-His-Tyr-Arg-Asn-Thr-Pro-Tyr-Tyr-Glu-Gly-Val-Gln-Arg-Tyr-Cys-
80 85 90 95
Arg-Ser-Arg-Glu-Lys-Gly-Pro-Tyr-Ala-Ala-Lys-Thr-Asp-Gly-Val-Arg-
100 105 110
Gln-Val-Gln-Pro-Tyr-Asn-Gln-Gly-Ala-Leu-Leu-Tyr-Ser-Ile-Ala-Asn-
115 120 125
Gln-Pro-Val-Ser-Val-Val-Leu-Gln-Ala-Ala-Gly-Lys-Asp-Phe-Gln-Leu-
130 135 140
Tyr-Arg-Gly-Gly-Ile-Phe-Val-Gly-Pro-Cys-Gly-Asn-Lys-Val-Asp-His-
145 150 155
Ala-Val-Ala-Ala-Val-Gly-Tyr-Asn-Pro-Gly-Tyr-Ile-Leu-Ile-Lys-Asn-
160 165 170 175
Ser-Trp-Gly-Thr-Gly-Trp-Gly-Glu-Asn-Gly-Tyr-Ile-Arg-Ile-Lys-Arg-
180 185 190
Gly-Thr-Gly-Asn-Ser-Tyr-Gly-Val-Cys-Gly-Leu-Tyr-Thr-Ser-Ser-Phe-
195 200 205
Tyr-Pro-Val-Lys-Asn-COOH
210 212

Figura 2.2. Structura primară a papainei

2.2.2. Structura secundară

Structura secundară a enzimelor reprezintă structura tridimensională de bază conținând aranjamentul spațial al principalilor atomi ce constituie scheletul catenei polipeptidice, fără a ține cont de conformația catenelor laterale și de relațiile cu alte segmente. Structura secundară se bazează pe formarea de legături de hidrogen în cadrul aceleiași catene polipetidice, donorul fiind hidrogenul grupării NH al unui aminoacid, iar acceptorul oxigenul carbonilic al altui aminoacid. Realizarea unei asemenea legături de hidrogen intracatenare se poate realiza doar prin răsucirea a două legături cu rotire liberă, astfel ca grupările respective să devină stereochimic adiacente.

S-a arătat că din cauza caracterului parțial de dublă legătură, a legăturii carbon-azot, cei șase atomi ai unei unități peptidice vor trebui să se găsească în același plan. Singurele legături din scheletul de bază care permit rotația liberă în aceste condiții sunt legăturile simple din cadrul fiecărui rest de aminoacid (Figura 2.3.a) (Campbell, 1995).

- legătura dintre α-atomul de carbon și atomul de azot amidic;
- legătura dintre α-atomul de carbon și atomul de carbon carbonilic.

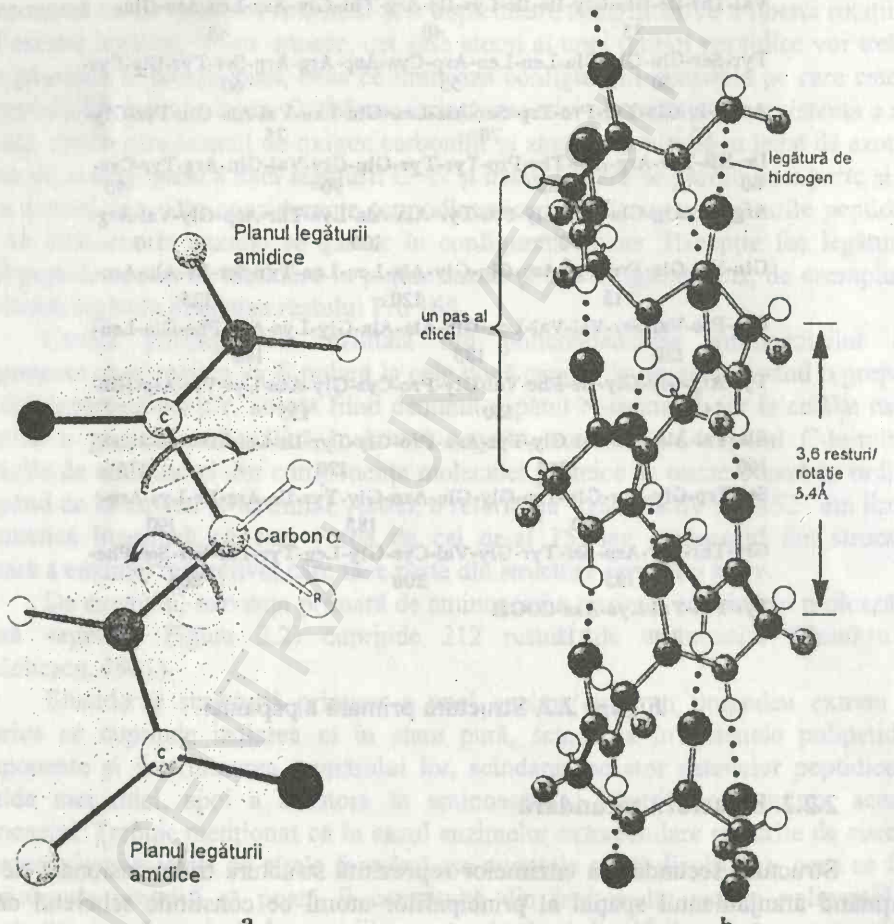


Figura 2.3. Structura secundară și conformația de α-elice a enzimelor

S-a demonstrat că pentru formarea unor legături de hidrogen intracatenare stabile există două conformații pe care le poate adopta catena polipeptidică:

α-elicoidală şi β-pliată. Există şi alte structuri posibile, însă acestea sunt de departe cele mai importante.

În structura α -elicoidală, ce se întâlneşte în interiorul aceleiaşi catene polipeptidice, această catenă este răsucită ca în jurul unui cilindru şi permite un aranjament liniar al atomilor implicaţi în legătura de hidrogen, ceea ce conferă legăturii tăria maximă posibilă. Pentru aceasta este necesar ca între cele două grupări implicate să fie cel puţin 3 resturi de aminoacizi. S-a demonstrat experimental că un pas de elice este format din 3,6 aminoacizi, α-elicea este orientată spre dreapta, iar distanţa dintre două puncte echivalente, corespunzătoare unor rotaţii succesive, este de 5,4 Å (Figura 2.3b).

Cel de-al doilea tip de structură secundară întâlnit la enzime este structura β-pliată, care ia naştere datorită legăturilor de hidrogen ce se stabilesc mai ales între catene polipeptidice diferite. Aceasta diferă total de structura elicoidală, deoarece scheletul polipeptidic nu mai este răsucit ci aproape complet întins (Figura 2.4).

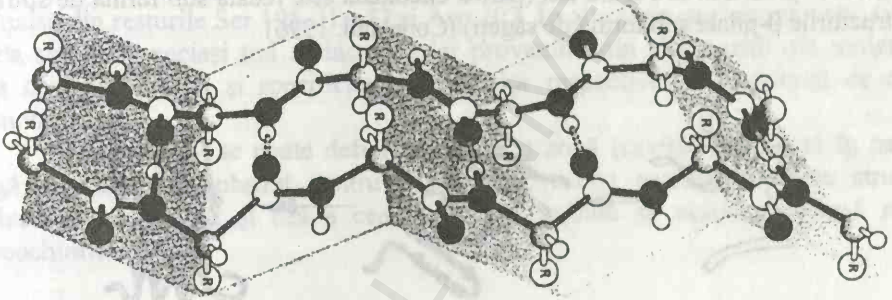


Figura 2.4. Structura secundară β-pliată antiparalelă a enzimelor.

Dacă cele două catene polipetidice merg în aceeaşi direcţie (considerând de la capătul N-terminal spre cel C-terminal), vom avea o structură β-pliată paralelă, iar dacă merg în sens invers, o structură β-pliată antiparalelă. Formarea legăturilor de hidrogen între catenele polipeptidice duce la un aranjament în zig-zag a fragmentelor peptidice, care a primit din acest motiv denumirea de structură pliată.

Structurile α-elicoidale şi cele β -pliate sunt combinate într-o serie de modalităţi în proteine şi enzime, întrucât catena polipeptidică se răsuceşte de mai multe ori. Această răsucire se face, din considerente sterice, doar în dreptul unor aminoacizi care pot avea o conformaţie care se poate răsuci invers pentru a permite întoarcerea catenei. Acest lucru este posibil în cazul glicinei, care are doar un atom de hidrogen în catena laterală ce nu creează probleme de împiedicare sterică şi în cazul prolinei care are o structură ciclică. Combinaţiile care iau naştere in acest mod sunt numite structuri supersecundare, cele mai răspândite fiind cele de tipul *βαβ*, în care două strucuri β -pliate antiparalele sunt conectate prin intermediul unei structuri α-elicoidale.

2.2.3. Structura terțiară

Structura terțiară a unei molecule de enzimă constă din aranjamentul spațial al tuturor atomilor, fără a ține cont de relațiile cu moleculele vecine sau cu subunități ale moleculei. Conformațiile grupărilor care fac parte din catenele laterale și cele ale grupărilor prostetice sunt componente ale structurii terțiare, cât și aranjamentele unele față de altele ale secțiunilor elicoidale și ale celor pliate. Principalele legături de tip covalent implicate în menținerea structurii terțiare sunt punțile disulfidice, care pot fi inter- sau intramoleculare. Alături de acestea, la stabilizarea structurilor terțiare mai contribuie legăturile de hidrogen, legăturile ionice, legăturile coordinative ale ionilor metalici și legăturile hidrofobe de tip Van der Waals. Putem considera că diferitele elemente ale structurii secundare se aranjează unele față de altele într-un spațiu tridimensional realizându-se anumite legături între aminoacizii din aceeași catenă sau cei din catene diferite și rezultând structura terțiară a enzimei respective. Un exemplu de asemenea aranjament, prin trecere de la structura primară la cea secundară și apoi terțiară este prezentat în Figura 2.5 (partea elicoidală este redată sub formă de spirală, iar structurile β-pliate sub formă de săgeți) (Copeland, 1996).

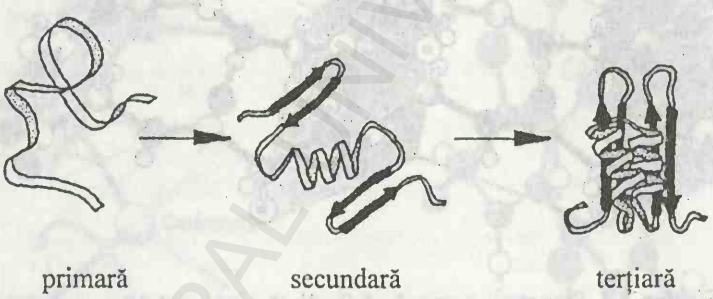
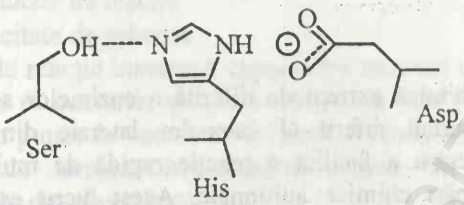


Figura 2.5. Organizarea structurală a enzimelor, de la structura primară la cea terțiară

Structura terțiară se poate determina combinând rezultatele obținute prin analiză de difracție cu raze X și rezonanță magnetică nucleară bidimensională. În acest mod, a fost posibilă elaborarea unor modele moleculare care redau structurile terțiare respective. La ora actuală a fost determinată structura terțiară a unui mare număr de enzime. Aceste structuri de găsesc în bănci de date specializate, de exemplu *www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes* al European Bioinformatics Institute, care la data de 11 februarie 2005 conținea un număr de 14.285 de structuri.

Cunoașterea structurilor terțiare are o mare importanță deoarece permite stabilirea conformației centrului catalitic activ. În cazul enzimelor rolul principal al organizării moleculei într-o structură terțiară răsucită (folding) este aducerea unor resturi de aminoacizi aflate în diferite părți ale catenei polipeptidice într-o proximitate geometrică, tocmai în scopul formării acestor centre active. Un exemplu tipic în acest sens sunt serin-proteazele, care scindează anumite legături peptidice din moleculele

proteinelor. Toate aceste enzime trebuie să conţină în centrul lor activ un rest de serină care acţionează ca agent nucleofil de bază la atacarea legăturii peptidice. Pentru a creşte nucleofilicitatea acestuia, hidroxilul serinic participă la o legătură de hidrogen cu un atom de azot din restul de histidină aflat tot în centrul activ. Hidrogenul legat de celălalt atom de azot al histidinei participă la rândul său la o legătură de hidrogen cu oxigenul dintr-un rest de aspartat, al treilea constituent al centrului activ.



Această tripletă, Ser-His-Asp se numeşte triadă catalitică şi este caracteristică tuturor serin-proteazelor. De exemplu în enzima chimotripsină, triada catalitică este compusă din resturile Ser 195, His 57 şi Asp 102. În alte serin-proteinaze vom avea în triada catalitică aceiaşi trei aminoacizi dar provenind din alte poziţii ale moleculei, ceea ce înseamnă că şi specificitatea enzimelor respective va fi diferită de cea a chimotripsinei.

Centrul activ se poate defini aşadar ca o zonă (cavitate) distinctă în care se leagă molecula de substrat pentru a se iniţia reacţia enzimatică. Între structura moleculei de substrat şi cea a centrului activ trebuie să existe o strânsă relaţie stereochimică.

2.2.4. Structura cuaternară

Structura cuaternară reprezintă cel mai înalt nivel de organizare a macromoleculei proteice, constînd în aranjamentul subunităţilor ei în spaţiu şi ansamblul interacţiunilor dintre aceste subunităţi, fără a ţine cont însă de geometria internă a subunităţilor. De multe ori, apariţia funcţiei biologice necesită existenţa nu doar a unei singure catene polipeptidice răsucite ci a mai multor asemenea catene. Fiecare subunitate a structurii cuaternare reprezintă o catenă polipetidica, ce posedă o structură primară, secundară şi terţiară proprie. Aceste catene polipeptidice sunt legate necovalent. Cea mai mică subunitate se numeşte monomer, structura constituită din cel puţin doi monomeri se numeşte multimer, iar starea asociată respectivă structură cuaternară sau agregat cuaternar. În general, enzimele cu structură cuaternară sunt constituite din subunităţi identice (homomultimeri), dar există şi enzime formate din subunităţi diferite (heteromultimeri). Activitatea biologică poate fi o proprietate specifică numai multimerului dar şi monomerii pot poseda funcţie catalitică. Astfel, enzima prostaglandin sintază este un homodimer, în care fiecare subunitate are câte un centru activ ce acţionează independent. În schimb în citocrom oxidaze, centrul activ se găseşte în subunitatea 1, iar alte 3-12 subunităţi (în funcţie de specie), au rolul de a

stabiliza structura şi de a modifica activitatea specifică a enzimei. Există şi enzime în care resturile de aminoacizi din centrul activ provin din mai multe subunităţi ale moleculei, un exemplu în acest sens fiind HIV proteaza (Copeland, 1996).

În cazul enzimelor formate din două sau mai multe catene polipeptidice, legate între ele prin legături de tip covalent (de exemplu punţi disulfidice), aceste catene trebuie considerate ca unităţi constituente ale unei structuri terţiare şi nu cuaternare.

2.3. Cofactori

Reactivitatea chimică extrem de diferită a enzimelor se datoreşte în esenţă structurii şi aranjamentului diferit al catenelor laterale din cei 20 aminoacizi componenţi. Totuşi, pentru a facilita o reacţie rapidă de multe ori este necesară încorporarea unor grupări chimice adiţionale. Acest lucru este posibil doar prin includerea unor grupări de natură neproteică în structura centrului activ al enzimelor. Aceste grupări sunt denumite generic cofactori sau coenzime. În unele cazuri cofactorul este asociat cu enzima printr-o legătură covalentă. De exemplu, în cazul aspartat aminotransferazei, cofactorul piridoxal fosfat se leagă prin formarea unei baze Schiff de restul de lizină din centrul activ. În majoritatea cazurilor însă asocierea dintre enzimă şi cofactor se face printr-o legătură necovalentă. În aceste situaţii, de multe ori cofactorul poate fi îndepărtat de apoenzimă şi mai târziu poate fi readus pentru a se redobândi activitatea catalitică (Copeland, 1996).

Natura chimică a cofactorilor este foarte diversă. Asemenea cofactori sunt ionii de zinc, magneziu şi cupru, piridoxal fosfatul, flavina, hemul, coenzima A, NAD (nicotinamid-adenin-dinucleotid) sau NADP (nicotinamid-adenin-dinucleotid fosfatul).

2.4. Specificitatea enzimelor

Enzimele sunt biocatalizatori care respectă în principiu toate legile catalizei:

- nu se consumă în timpul reacţiei şi pot determina, în principiu, transformarea unui număr nelimitat de molecule de substrat, eventuala denaturare a enzimei fiind independentă de actul catalitic;
- nu modifică natura reacţiei, echilibrul sau bilanţul termodinamic, reacţia fiind posibilă şi în absenţa lor;
- determină creşterea însemnată a vitezei de reacţie în comparaţie cu cea înregistrată în absenţa biocatalizatorului.

În general catalizatorii determină creşterea vitezei unor reacţii, posibile din punct de vedere termodinamic, prin scăderea energiei de activare. Marele avantaj al enzimelor este că, în comparţie cu alţi catalizatori, realizează o accelerare mult mai pronunţată a reacţiei catalizate. Explicaţia acestei comportări rezidă în scăderea pronunţată a energiei de activare a reacţiilor respective, datorită stabilizării stării de tranziţie. Astfel, energia de activare a reacţiei de descompunere H_2O_2 este în reacţia necatalizată 18 kcal/mol, în prezenţă de Pt fin divizată 111,7 kcal/mol, iar în prezenţa enzimei catalază 5,5 kcal/mol (Campbell, 1995).

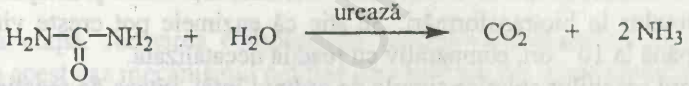
Creşterea însemnată a vitezei reacţiilor catalizate de enzime se referă doar la anumite substraturi a căror transformare va fi favorizată în prezenţa enzimei. Aceasta este de fapt cea mai importantă proprietate a enzimelor utilizată pentru realizarea biotransformărilor şi poartă numele de specificitate. Prin specificitate se înţelege aşadar capacitatea enzimelor de a cataliza un anumit tip de reacţie şi, în unele cazuri, doar transformarea unui singur substrat. Ea poate fi de două tipuri:

- Specificitate de reacţie
- Specificitate de substrat

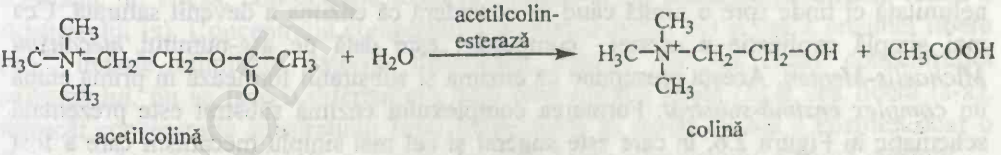
Specificitatea de reacţie înseamnă capacitatea enzimei de a cataliza un anumit tip de reacţie. Pe baza ei enzimele pot fi împărţite în cele şase clase care au fost prezentate anterior. Din punct de vedere al aplicaţiilor biocatalitice, cele mai eficiente s-au dovedit a fi de departe hidrolazele, urmate de enzimele din clasa oxidoreductazelor şi cele din clasa liazelor.

Specificitatea de substrat a enzimelor poate fi de patru tipuri (Dumitru şi Iordăchescu, 1981).

*a. **Specificitate absolută de substrat,*** când enzima nu acţionează decât asupra unei singure substanţe chimice. Acest tip de specificitate este întâlnit la un număr mic de enzime. De exemplu ureaza catalizează numai reacţia de hidroliză a ureii, dar nu şi a ureilor substituite.

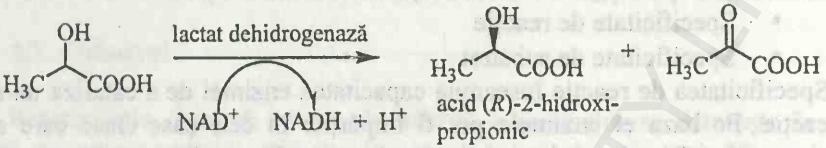


*b. **Specificitate absolută de grup**,* când enzima acţionează asupra unui număr de substanţe înrudite structural care conţin un anumit tip de legătură şi un atom sau o grupare de atomi pe care enzima "le recunoaşte". Astfel, acetilcolinesteraza catalizează reacţia de hidroliză a acetilcolinei, dar şi hidroliza unui număr mare de alţi esteri acetici, deci ea recunoaşte legătura esterică şi gruparea acetil.



*c. **Specificitate relativă de grup,*** care se manifestă numai faţă de un anumit tip de legătură. Astfel, lipazele catalizează hidroliza esterilor glicerinei cu acizii graşi, dar şi a multor altor esteri alifatici şi aromatici, enzima recunoscând practic legătura esterică. În cadrul acestui tip de slabă specificitate, evident va exista o diferenţă între vitezele cu care sunt transformate diferite substraturi, în funcţie de structura acestora. Această proprietate se numeşte selectivitate şi ea poate fi chemoselectivitate sau regioselectivitate. Chemoselectivitatea şi regioselectivitatea vor fi discutate la lipaze.

d. Specificitate stereochimică (enantiospecificitate), care se manifestă față de numai unul din izomerii optici ai unor compuși care conțin centri de asimetrie. De exemplu, lactat dehidrogenaza din *Bacillus subtilis* catalizează oxidarea doar a acidului (*S*)-2-hidroxi propionic (acidul L-lactic) la acid piruvic, enantiomerul celălalt rămânând nemodificat:



Trebuie menționat că marea majoritate a reacțiilor catalizate de enzime în organismele vii sunt enantiospecifice. Această enantiospecificitate poate să se manifeste concomitent cu oricare dintre celelalte trei tipuri de specificitate de substrat și reprezintă cea mai importantă proprietate a enzimelor punct de vedere al aplicațiilor biocatalitice.

2.5. Cinetica reacțiilor enzimatice

Cunoașterea cineticii reacțiilor enzimatice este foarte importantă deoarece, alături de specificitate, accelerarea reacțiilor catalizate reprezintă principalul avantaj al utilizării enzimelor în biotransformări. Se știe că enzimele pot crește viteza reacției catalizate de până la 10^{20} ori, comparativ cu reacția necatalizată.

În cazul reacțiilor chimice simple de ordinul întâi, viteza de reacție depinde de concentrația reactantului, astfel încât viteza crește nelimitat odată cu creșterea acestei concentrații. Constanta de proporționalitate care corelează viteza reacției și concentrația reactantului reprezintă constanta de viteză a reacției respective.

În cazul reacțiilor enzimatice cu un singur substrat (prin substrat se înțelege compusul chimic a cărui transformare este catalizată de enzimă) viteza crește de asemenea cu creșterea concentrației substratului, dar această creștere nu mai este nelimitată ci tinde spre o limită când se consideră că enzima a devenit saturată. Cea mai simplă explicație a acestei comportări este dată de așa-numitul *mecanism Michaelis-Menten*. Acesta presupune că enzima și substratul formează în prima etapă un *complex enzimă-substrat*. Formarea complexului enzimă substrat este prezentată schematic în Figura 2.6, în care este sugerat și cel mai simplu mecanism care a fost propus pentru cataliza enzimatică: mecanismul lacăt-cheie. În acest model substratul se leagă de centrul activ aflat pe suprafața apoenzimei, poziționarea corectă realizându-se cu ajutorul grupelor prostetice. Forma substratului trebuie să se potrivească cu forma cavității centrului activ așa cum o cheie trebuie să se potrivească într-un lacăt. Odată format complexul enzimă-substrat începe procesul de rupere a unor legături și de formare a altora, iar după formarea produsului sau produșilor aceștia părăsesc centrul activ și procesul poate fi reluat cu o nouă moleculă de substrat.

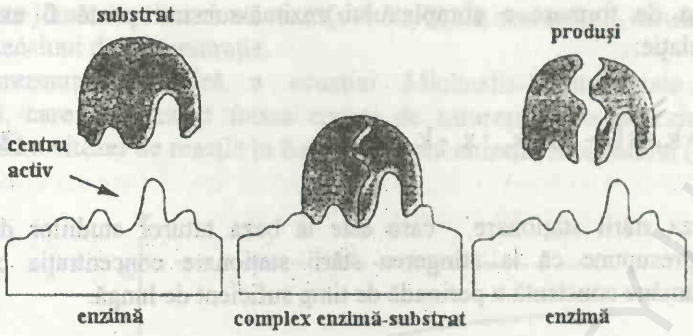


Figura 2.6. Modelul lacăt-cheie al mecanismului reacţiilor catalizate de enzime

Dacă considerăm o reacţie enzimatică ce are loc conform unui mecanism Michaelis-Menten cu un singur substrat, această reacţie poate fi scrisă schematic astfel (S reprezintă substratul, E enzima, iar P produsul) (Roberts, 1977).

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES^* \xrightarrow{k_2} P + E$$

(e-s) s x p

Prima etapă, formarea complexului enzimă-substrat, poate fi tratată ca un echilibru şi în acest caz mecanismul conţine următoarele trei etape elementare:

(1) enzima şi substratul interacţionează într-o etapă bimoleculară, formând complexul enzimă-substrat cu viteza k_1;

(2) complexul enzimă substrat poate disocia cu viteza k_{-1} regenerând enzima şi substratul sau (3) poate duce la obţinerea produsului de reacţie cu viteza k_2, regenerând enzima liberă. Aceste ultime două reacţii sunt monomoleculare.

Ecuaţia de viteză pentru acest tip de reacţii se va scrie în funcţie de aceste constante de viteză, concentraţia totală a enzimei (e) şi concentraţia iniţială totală a substratului (s). Concentraţia complexului enzimă-substrat (x) şi cea a enzimei libere (e-x) trebuie eliminate datorită dificultăţii măsurii lor. În cazul concentraţiei substratului, nu se face o diferenţiere între concentraţia totală (s) şi cea liberă (s-x), întrucât concentraţia substratului fiind foarte mare în raport cu cea a enzimei doar o foarte mică parte, neglijabilă, a ei se va găsi sub forma complexului enzimă-substrat.

Viteza formării produsului de reacţie este proporţională cu concentraţia complexului enzimă-substrat:

$$v = \frac{dp}{dt} = k_2 \cdot x \qquad (2.1)$$

Viteza de formare a complexului enzimă-substrat poate fi exprimată cu următoarea relație:

$$\frac{dx}{dt} = k_1 \cdot s(e - x) - k_{-1} \cdot x - k_2 \cdot x \qquad (2.2)$$

Ipoteza stării staționare, care este la baza tuturor studiilor de cinetică enzimatică, presupune că la atingerea stării staționare concentrația complexului intermediar rămâne constantă o perioadă de timp suficient de lungă.

$$\frac{dx}{dt} = 0$$

În aceste condiții din ecuația (2.2) rezultă:

$$x = \frac{k_1 \cdot s \cdot e}{k_1 \cdot s + k_{-1} + k_2} \qquad (2.3)$$

Înlocuind această valoare a concentrației complexului enzimă-substrat în ecuația (2.1) se obține:

$$v = \frac{k_2 \cdot s \cdot e}{s + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \qquad (2.4)$$

sau, într-o formă mai generală, rezultă ecuația Michaelis-Menten pentru reacțiile cu un singur substrat. Această ecuație, fundamentală pentru cinetica enzimatică, a fost enunțată în anul 1913 (Michaelis şi Menten, 1913).

$$v = \frac{V_m \cdot s}{K_m + s} \qquad (2.5)$$

Se observă din ecuația (2.4) că odată cu creşterea concentrației inițiale a substratului viteza de reacție va creşte, la început aproximativ proporțional apoi mai încet, atingând o limită maximă egală cu $k_2 \cdot e$ (când s devine foarte mare în comparație cu raportul $(k_{-1}+k_2)/k_1$. Acest parametru $V_m = k_2 \cdot e$ reprezintă deci viteza maximă a reacției enzimatice (Piszkiewitz, 1977).

Celălalt parametru $K_m=(k_{-1}+k_2)/k_1$) este numit *constanta Michaelis*. Semnificația sa poate fi dedusă dacă presupunem $K_m=s$ şi înlocuim în ecuația (2.5). Rezultă imediat faptul că K_m reprezintă acea concentrație de substrat pentru care viteza

de reacţie este jumătate din cea maximă ($v = V_m/2$). În consecinţă, constanta Michaelis va avea dimensiuni de concentraţie.

Reprezentarea grafică a ecuaţiei Michaelis-Menten este o hiperbolă rectangulară, care redă exact forma curbei de saturaţie care reprezintă şi variaţia experimentală a vitezei de reacţie în funcţie de concentraţia substratului (Figura 2.7).

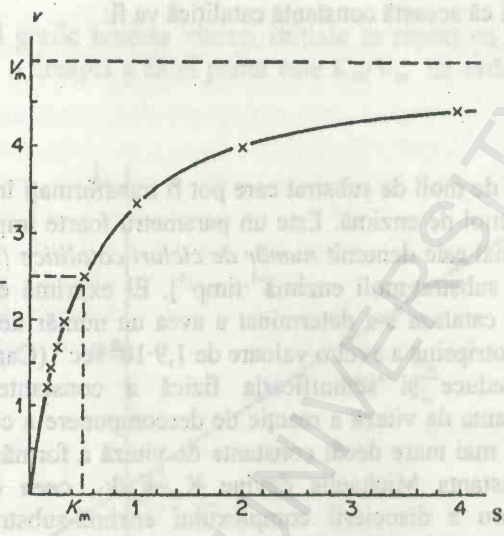


Figura 2.7. Reprezentarea grafică a ecuaţiei Michaelis-Menten

Dacă s este mic ($s<<<K_m$), viteza de reacţie este direct proporţională cu concentraţia substratului:

$$v = \frac{V_m \cdot s}{K_m}$$

şi reacţia este de ordinul 1 în raport cu concentraţia iniţială a substratului. Deci la concentraţii iniţiale mici de substrat, raportul V_m/K_m are semnificaţia unei constante de viteză de ordinul unu. El se mai numeşte *constantă de specificitate*, caracterizând capacitatea enzimei de a distinge un anumit substrat de alt substrat care poate determina o reacţie competitivă.

Dacă în schimb valorile lui s sunt mari ($s>>>K_m$) viteza de reacţie devine aproximativ egală cu V_m şi reacţia este de ordinul zero în raport cu substratul s. Acest lucru este valabil când enzima este saturată cu substrat şi o creştere în continuare a concentraţiei substratului nu mai duce la creşterea vitezei de reacţie. Viteza maximă depinde de concentraţia enzimei şi nu poate fi măsurată direct în general, întrucât

vitezele de saturație se ating destul de încet la o serie de reacții enzimatice. De aceea se determină prin extrapolare.

Dacă se consideră că enzima este saturată cu substratul și descompunerea complexului enzimă-substrat reprezintă etapa determinantă de viteză a procesului enzimatic, constanta de viteză k_2 a acestei etape va fi de fapt constanta catalitică a întregului proces și se notează cu k_{cat}. Ținând cont că viteza maximă a fost definită drept $V_m=k_2 \cdot e$, rezultă că această constantă catalitică va fi:

$$k_{cat} = \frac{V_m}{e}$$

și reprezintă numărul de moli de substrat care pot fi transformați în produs, în unitatea de timp, de către un mol de enzimă. Este un parametru foarte important din punct de vedere practic, care mai este denumit *număr de cicluri catalitice (turnover number)* și se exprimă în [moli substrat·moli enzimă$^{-1}$·timp^{-1}]. El exprimă eficiența catalitică a enzimei, de exemplu catalaza s-a determinat a avea un număr de cicluri egal cu 10^7 sec^{-1}, în timp ce chimotripsina a avut o valoare de $1{,}9 \cdot 10^2$ sec^{-1} (Campbell, 1995).

Se poate deduce și semnificația fizică a constantei Michaelis, dacă presupunem că constanta de viteză a reacție de descompunere a complexului enzimă-substrat k_{-1} este mult mai mare decât constanta de viteză a formării produsului k_2. În această situație, constanta Michaelis devine $K_m=k_{-1}/k_1$, ceea ce reprezintă chiar constanta de echilibru a disocierii complexului enzimă-substrat. Rezultă că K_m exprimă afinitatea enzimei față de substratul respectiv, cu alte cuvinte cât de puternic este legat substratul de enzimă. Cu cât valoarea acestui parametru este mai mare, cu atât afinitatea enzimei pentru substratul respectiv este mai mică.

O afinitate mare pentru substrat corelată cu un număr mare de cicluri catalitice definesc o "super-enzimă" pentru o anumită aplicație. Din acest motiv, raportul k_{cat}/K_m este considerat ca fiind măsura cea mai exactă a eficienței catalitice, ea atingând valori de 10^8-10^9 în cazul enzimelor care sunt atât de eficiente încât reacțiile lor ajung să fie limitate de difuzie.

Cunoașterea parametrilor K_m și V_m este de mare importanță în studiul reacțiilor enzimatice. Pentru determinarea lor experimentală trebuie mai întâi calculate vitezele inițiale de reacție ale proceselor catalizate de enzimele respective la diferite concentrații inițiale de substrat. Vitezele inițiale se determină prin metode spectrofotometrice, fluorimetrice, cromatografice, polarografice, etc. Trebuie însă menționat că valorile acestor parametri sunt constante doar în condiții bine stabilite (Ferdinand, 1976). Dacă se schimbă de exemplu valorile temperaturii sau pH-ului la care sunt efectuate determinările sau tăria ionică a soluției tampon, vom obține valori diferite pentru acești parametri. Totuși, în condiții definite, constanta Michaelis și viteza maximă ne pot da informații foarte utile despre felul în care enzima se comportă în raport cu reacția respectivă.

Calculul constantelor K_m și V_m se face în majoritatea cazurilor prin metode grafice, bazate pe liniarizarea ecuatiei Michaelis-Menten. Există mai multe metode,

dintre care cea mai des utilizată este *liniarizarea Lineweaver-Burk*. Aceasta se face inversând ambii membri ai ecuației (2.5):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{V_m} \qquad (2.6)$$

Reprezentând grafic inversa vitezei inițiale în raport cu inversa concentrației substratului, obținem o dreaptă a cărei pantă este K_m/V_m iar ordonata la origine $1/V_m$ (Figura 2.8).

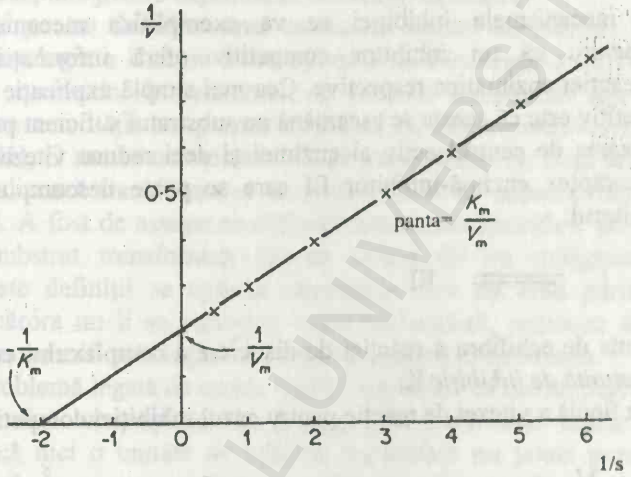


Figura 2.8. Calculul parametrilor cinetici K_m și V_m prin liniarizare Lineweaver-Burk.

Reacțiile enzimatice cu un singur substrat reprezintă modelul cel mai simplu de reacții enzimatice. Pentru alte cazuri, cum ar fi reacțiile cu două sau mai multe substraturi, au fost deduse de asemenea ecuațiile cinetice corespunzătoare (Roberts, 1977).

2.6. Inhibiția reacțiilor enzimatice

Compușii care acționează în sensul reducerii vitezei unei reacții enzimatice se numesc inhibitori, iar fenomenul se numește *inhibiție*, tot așa cum creșterea vitezei de reacție se numește *activare*, iar compușii respectivi, activatori. Inhibitorii pot fi chiar substraturile sau produșii reacției enzimatice, situații în care avem inhibiție de substrat, respectiv inhibiție de produs. Inhibiția poate fi reversibilă sau ireversibilă. Inhibitorii ireversibili cauzează denaturarea proteinei enzimatice, în timp ce inhibitorii reversibili formează în general complecși cu enzimele și ca urmare doar o cantitate mai mică de

enzimă rămâne disponibilă pentru secvența normală de reacție. În cazul îndepărtării inhibitorului din sistem, activitatea enzimei revine la valoarea inițială.

Principalele tipuri de inhibiție întâlnite în cataliza enzimatică sunt:

- inhibiția competitivă, care se manifestă prin creșterea valorii constantei K_m
- inhibiția necompetitivă pură sau clasică, ce se manifestă prin scăderea valorii vitezei maxime de reacție
- inhibiția mixtă, în care apar concomitent creșterea lui K_m și reducerea lui V_m
- inhibiție incompetitivă sau anticompetitivă, când atât V_m cât și K_m sunt reduse cu un raport constant.

Dintre mecanismele inhibiției se va exemplifica mecanismul inhibiției competitive, pentru că un inhibitor competitiv oferă informații utile despre specificitatea reacției enzimatice respective. Cea mai simplă explicație a acțiunii unui inhibitor competitiv este că acesta se aseamănă cu substratul suficient pentru a concura cu acesta la fixarea de centrul activ al enzimei și deci reduce viteza de reacție. Se formează un complex enzimă-inhibitor EI care se poate descompune, regenerând enzima și inhibitorul:

$$E + I \rightleftharpoons EI$$

Constanta de echilibru a reacției de disociere a complexului enzimă-inhibitor se numește *constantă de inhibiție* K_i.

Ecuația finală a vitezei de reacție pentru cazul inhibiției competitive este:

$$v = \frac{V_m \cdot s}{K_m\left(1 + \frac{i}{K_i}\right) + s} \qquad (2.7)$$

unde i reprezintă concentrația inhibitorului. Ecuația (2.7) devine o ecuație simplă de tip Michaelis-Menten dacă notăm:

$$K_m^{ap} = K_m\left(1 + \frac{i}{K_i}\right) \qquad (2.8)$$

ceea ce arată că inhibitorul competitiv nu modifică viteza maximă de reacție V_m, în schimb determină scăderea vitezei reacției enzimatice prin mărirea valorii constantei K_m cu factorul $(1+i/K_i)$. Din relația 2.7 se mai observă că ponderea inhibiției scade odată cu creșterea concentrației substratului.

2.7. Exprimarea activității enzimelor

Activitatea catalitică este cea mai importantă caracteristică a unei enzime. Exprimarea cantitativă a acestei activități nu se poate face direct, întrucât ea depinde foarte mult de substratul asupra căruia acționează enzima, majoritatea enzimelor fiind active asupra unui număr mai mare de asemenea substraturi. Din considerente practice, s-a ales exprimarea activității prin efectul reacției catalizate de enzima respectivă. Aceasta înseamnă măsurarea vitezei unei anumite reacții definite, în condiții strict controlate. Reacția aleasă este de preferat să fie de ordinul întâi. Chiar dacă rezultatul măsurătorii depinde mult de condițiile concrete ale analizei, este de dorit să existe o unitate general acceptată pentru exprimarea activității catalitice.

Eforturile pentru definirea unei asemenea unități au început în 1961, când Comisia de Enzimologie a Uniunii Internaționale de Biochimie a introdus măsurarea vitezei reacțiilor enzimatice în micromoli de substrat transformat într-un minut, iar pentru exprimarea activității s-a propus noțiunea de *unitate enzimatică* (Dumitru și Iordăchescu, 1981). O asemenea unitate (U) se poate defini ca fiind acea cantitate de enzimă care catalizează transformarea unui micromol de substrat într-un minut, în condiții standard. A fost de asemenea definită *activitatea specifică*, drept numărul de micromoli de substrat transformați într-un minut de un miligram de proteină enzimatică. Aceste definiții se aplicau enzimelor care nu erau purificate până la omogenitate și cărora nu li se cunoștea masa moleculară, noțiunea de cantitate de enzimă neavând o semnificație legată de masa de enzimă propriu-zisă.

O altă problemă legată de aceste unități era faptul că ele nu puteau fi acceptate în cadrul Sistemului Internațional de Unități (S.I.) din mai multe motive, unul important fiind că nici o unitate de măsură particulară nu poate avea în denumire cuvântul "unitate". În aceste condiții, în 1972, Comisia de Enzimologie a propus abandonarea denumirii de "unitate" în favoarea celei de "katal" (Dybkaer, 2002). A fost definită noțiunea de activitate catalitică (notație *z*), ce a suferit mai multe ajustări, fiind adoptată în cele din urmă în anul 1995 de IUPAC/IFFC astfel: este proprietatea unui component, măsurată prin viteza de conversie catalizată de acesta a cantității dintr-o substanță, într-o reacție chimică specificată și într-un sistem de măsură specificat.. Trebuie menționat că această definiție se referă la catalizatori în mod general și nu numai la catalizatorii enzimatici și că activitatea catalitică, deși se definește printr-o viteză de conversie (exprimată în moli/sec), nu reprezintă o viteză de conversie în sine. Activitatea catalitică este o caracteristică cantitativă a catalizatorului și nu a cineticii de reacție.

După o serie de discuții și modificări, în cele din urmă în anul 2000 katalul a fost adăugat la Sistemul Internațional de Unități ca unitate derivată, notat prescurtat cu kat și măsurat în s^{-1}·mol. De asemenea a fost adoptat termenul de concentrație de *activitate catalitică* sau *concentrație catalitică*, exprimat în kat/m^3 (dar se acceptă și kat/L). Relația de transformare din unități enzimatice in katali este:

$$1\ U = 1{,}667 \cdot 10^{-9}\ kat$$

Se utilizează şi termenul de *activitate molară*, care reprezintă activitatea raportată la cantitatea de enzimă exprimată în moli şi se măsoară în kat/mol enzimă. Aceasta ar fi de fapt modalitatea cea mai corectă de exprimare a activităţii, însă folosirea ei este limitată de faptul că de cele mai multe ori utilizatorul nu cunoaşte masa moleculară exactă a enzimei cu care lucrează.

Folosirea acestor unităţi pentru activitatea enzimatică este avantajoasă din mai multe motive:

- se elimină posibililele confuzii legate de folosirea cuvântului "unitate";
- termenul "katal" sugerează în mai mare măsură o proprietate a unui catalizator decât a unei reacţii chimice;
- permite prezentarea rezultatelor în laboratoarele clinice, unde noţiunile de tip "mol pe secundă şi litru" erau mai greu înţelese;
- facilitează utilizarea unităţilor din Sistemul Internaţional şi în acest domeniu.

Chiar dacă este recomandată folosirea unităţilor conforme cu Sistemul Internaţional, în practică încă se folosesc mult vechile unităţi enzimatice. Este însă foarte important ca atunci când activitatea unei enzime se determină prin măsurători de viteză iniţială de conversie a substratului sau a cantităţii de substrat transformate într-un anumit interval de timp, viteza de reacţie să rămână constantă în perioada respectivă.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. IMOBILIZAREA ENZIMELOR

3.1. Considerații generale

În raport cu catalizatorii obișnuiți, enzimele au două avantaje importante:

- Catalizează reacțiile chimice în condiții foarte blânde (temperaturi joase, presiune normală și în soluții apoase), reducând astfel consumurile energetice, coroziunea și efectele negative ale temperaturilor ridicate asupra substraturilor.

- Datorită specificității de substrat ridicate ponderea reacțiilor secundare este scăzută, ceea ce înseamnă atât reducerea costurilor cât și a poluării mediului ambiant.

Cu toate aceste avantaje, utilizarea industrială a enzimelor a fost destul de limitată deoarece majoritatea enzimelor sunt instabile *in vitro* (în afara mediului lor natural), costul izolării și purificării lor este ridicat, iar recuperarea enzimei solubilizate din amestecul de reacție în formă activă este foarte anevoioasă.

Pentru eliminarea acestor dezavantaje, au fost investigate două căi posibile:

a). Realizarea prin sinteză organică a unor compuși care să aibă structură și activitate cât mai asemănătoare enzimelor. Aceste enzime sintetice au fost denumite "sinzime" iar procesul catalitic ce le utilizează, cataliză biomimetică.

b). Insolubilizarea enzimelor prin legarea lor pe suporturi solide, procedeu numit imobilizare, iar enzimele respective enzime imobilizate.

Enzimele imobilizate pot fi definite ca enzime fixate sau localizate fizic într-un anumit spațiu geometric, cu menținerea activității lor catalitice și care pot fi utilizate în mod repetat și continuu. (Worsfold, 1995). Termenul de enzimă imobilizată se folosește începând din anul 1971, fiind o recomandare a primului Congres de Ingineria Enzimelor, care s-a ținut în acel an.

Istoria imobilizării enzimelor datează din 1916, când s-a descoperit că invertaza extrasă din drojdie și adsorbită pe cărbune activ a avut aceeași activitate catalitică cu enzima nativă (Nelson și Griffin, 1916). Prima tentativă de a imobiliza o enzimă pentru a-i îmbunătăți proprietățile urmărind o anumită utilizare datează din 1953, când Grubhofer și Schleith au imobilizat o serie de enzime ca diastaza, pepsina, ribonucleaza și carboxipeptidaza, folosind ca suport rășină de poliaminopolistiren diazotat (Prenosil ș.a., 1989). Începând din anii 1960 a avut loc o dezvoltare însemnată a cercetărilor privind enzimele imobilizate, cu scopul de a le utiliza drept catalizatori industriali în procese continue.

Prima utilizare industrială a enzimelor imobilizate a avut loc în anul 1969 în Japonia, la Tanabe Seiyaku Co., unde s-a folosit aminoacilaza fungică imobilizată prin legare ionică pentru obținerea L-aminoacizilor din amestecuri racemice. Tot același grup de cercetători, condus de Ichiro Chibata a realizat prima tehnologie industrială care folosea celule imobilizate, obținerea acidului L-aspartic din fumarat de amoniu cu ajutorul celulelor de *Escherichia coli* entrapate în gel de poliacrilamidă.

Principalele avantaje ale enzimelor imobilizate în raport cu cele solubile (libere, native) sunt următoarele:

- Permit utilizarea repetată a enzimei
- Procesele pot fi operate în regim continuu, ceea ce permite şi automatizarea lor
- Transformarea substratului se poate opri la un moment dat prin separarea catalizatorului printr-o simplă operaţie mecanică
- Nu mai apare problema impurificării produşilor de reacţie cu enzimă
- În unele cazuri activitatea şi stabilitatea se pot modifica în sens favorabil prin imobilizare
- Se pot trata, în condiţii economice, soluţii diluate de substrat (ape reziduale, subproduse, etc.).

Cu toate că enzimele, aşa cum s-a arătat, sunt produse de toate sistemele vii, cele de origine microbiană sunt cele mai indicate pentru utilizare industrială, din următoarele motive:

- Costurile de producţie sunt mai scăzute
- Obţinerea enzimelor nu este limitată de poziţie geografică sau anotimp
- Timpul necesar unui ciclu de producţie este mai scurt
- Se poate realiza mult mai uşor o producţie la scară industrială

Enzimele microbiene se clasifică în două categorii:

a. *Extracelulare*, care sunt eliberate de celule în mediul de cultură
b. *Intracelulare*, care sunt reţinute în interiorul celulei pe parcursul cultivării acesteia.

În aceste din urmă cazuri, este necesară extracţia enzimelor din celulele microbiene. Cu toate acestea, enzimele extracelulare sunt de multe ori instabile şi nepotrivite unor utilizări practice. Adăugând la acestea faptul că o serie de compuşi chimici se pot obţine prin metode fermentative utilizând capacitatea catalitică a sistemelor multienzimatice din microorganisme, apare justificată imobilizarea direct a celulelor microbiene. Primul asemenea procedeu industrial a fost elaborat în 1973 în Japonia pentru obţinerea acidului L-aspartic. La utilizarea celulelor imobilizate, apar o serie de probleme legate de permeabilitatea limitată a membranei celulare pentru substrat şi pentru produşi cât şi de posibilitatea apariţiei unor reacţii secundare.

Există însă şi o serie de avantaje ale imobilizării direct a celulelor:

1. În cazul utilizării unor sisteme multienzimatice, acestea sunt gata organizate în ordinea cerută de fluxul metabolic.
2. Se evită problemele legate de instabilitatea unor enzime.

3. În cazul reacţiilor enzimatice care necesită prezenţa unor cofactori sau coenzime, acestea sunt deja prezente în celule, nefiind necesară coimobilizarea lor.

În aceste condiţii, utilizarea celulelor imobilizate apare promiţătoare într-o serie de procese. O clasificare a celulelor imobilizate, propusa de Federaţia Europeană de Biotehnologie, secţia de Biocataliză Aplicată, este în celule viabile şi neviabile, iar cele viabile să fie subîmpărţite în celule în creştere (care cresc şi se dezvoltă în timpul utilizării) şi celule cu creşterea oprită sau respiratoare.

Clasificarea catalizatorilor enzimatici se poate face conform Figurii 3.1.

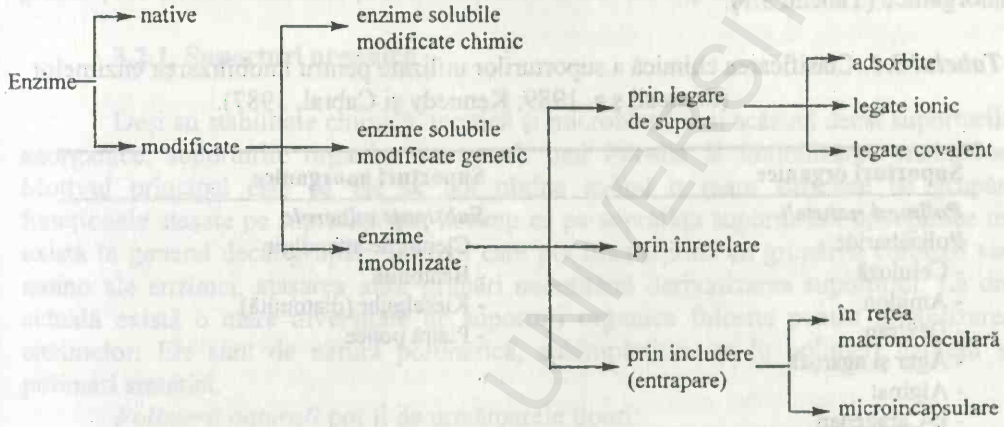


Figura 3.1. Tipuri de enzime utilizate în biocataliză

Dacă ţinem cont de această clasificare, rezultă că metodele de imobilizare vor fi de trei tipuri principale:

A. Legare de suport – constă în legarea enzimei de suporturi insolubile prin:
   - Adsorbţie fizică
   - Legare ionică
   - Legare covalentă

B. Înrețelare (reticulare) – constă în legarea intermoleculară a enzimelor cu ajutorul unor reactivi bifuncţionali sau multifuncţionali

C. Entrapare (incluziune) – constă în încorporarea enzimei într-o structură semipermeabilă, care poate fi de două tipuri:
   - Reţea macromoleculară de tip gel sau fibră
   - Membrană polimerică semipermeabilă, în care enzima se fixează prin microincapsulare

Pentru utilizarea biocatalizatorilor imobilizaţi, este importantă testarea prealabilă a activităţii enzimei respective în reacţia urmărită şi determinarea caracteristicilor funcţionale cum ar fi dependenţa activităţii de pH sau temperatură, cât

şi a principalilor compuşi care pot avea rol de activator sau inhibitor. Urmează selectarea materialului cel mai potrivit pentru imobilizare şi a metodei de imobilizare optime. Nu există o concepţie sistematică ce ar permite alegerea acestei metode, ea realizându-se deocamdată prin încercări.

3.2. Suporturi pentru imobilizarea enzimelor

Alegerea suportului pentru imobilizare este extrem de importantă, de ea depinzând în mare parte performanţele pe care le va avea enzima imobilizată.

În funcţie de natura lor chimică, suporturile pot fi clasificate în organice şi anorganice (Tabelul 3.1).

Tabelul 3.1. Clasificarea chimică a suporturilor utilizate pentru imobilizarea enzimelor (Prenosil ş.a, 1989; Kennedy şi Cabral, 1987).

Suporturi organice	Suporturi anorganice
Polimeri naturali	***Substanţe minerale***
Polizaharide	- Cleiuri de attapulgit
- Celuloză	- Bentonită
- Amidon	- Kieselguhr (diatomită)
- Dextran	- Piatră ponce
- Agar şi agaroză	
- Alginat	
- κ-Caragenan	
- Chitină şi chitosan	
Proteine	
- Colagen	
- Gelatină	
- Albumină	
- Mătase	
Materiale tip carbon (Cărbune activ)	
Polimeri sintetici	***Materiale sintetice***
- Polistiren	- Sticlă neporoasă
- Poliacrilaţi şi polimetacrilaţi	- Sticlă cu pori controlaţi
- Poliacrilamidă	- Oxizi metalici cu pori controlaţi
- Hidroxialchil metacrilaţi	- Metale
- Glicidil metacrilaţi	- Silicagel
- Polimeri sintetici pe bază de anhidridă maleică	
- Polimeri vinilici şi alilici	
- Poliamide	

Principalele calităţi pe care trebuie să le îndeplinească un bun suport pentru imobilizare sunt:

- suprafață specifică mare
- caracter hidrofil
- insolubilitate în mediul de reacție
- stabilitate mecanică, fizică și chimică
- formă și dimensiuni potrivite ale particulelor
- rezistență la atac microbian

De asemenea este foarte important ca suporturile să posede niște grupări suficient de active pentru a reacționa cu enzima în condiții cât mai blânde, astfel ca activitatea enzimei să nu fie afectată. Dacă suportul ca atare nu posedă asemenea grupări, ele trebuie introduse prin modificarea chimică a suportului.

3.2.1. Suporturi organice

Deși au stabilitate chimică, termică și microbiană mai scăzută decât suporturile anorganice, suporturile organice sunt mult mai folosite la imobilizarea enzimelor. Motivul principal este că ele se pot obține având o mare varietate de grupări funcționale atașate pe suprafața lor, în timp ce pe suprafața suporturilor anorganice nu există în general decât grupări hidroxil care pot interacționa cu grupările carboxil sau amino ale enzimei, atașarea altor grupări necesitând derivatizarea suportului. La ora actuală există o mare diversitate de suporturi organice folosite pentru imobilizarea enzimelor. Ele sunt de natură polimerică, subîmpărțindu-se în polimeri naturali și polimeri sintetici.

Polimerii naturali pot fi de următoarele tipuri:

- polizaharide: celuloză, amidon, dextran, agar și agaroză, alginat, chitină, etc.
- proteine: colagen, gelatină, albumină
- cărbune activ

Polimerii sintetici utilizați la imobilizarea enzimelor pot fi pe bază de:

- polistiren
- poliacrilați
- polimetacrilați
- poliamide
- poliacrilamide
- polimeri ai anhidridei maleice
- polimeri vinilici și alilici

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

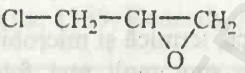
3.2.1.1. Suporturi naturale

Suporturi polizaharidice

Cele mai utilizate suporturi organice sunt cele cu structură polizaharidică, în special cele derivate din alge şi celuloză (Kennedy şi Cabral, 1987).

Celuloza conţine grupări hidroxil care nu sunt suficient de reactive pentru a forma direct legături cu enzima, însă ele pot fi activate prin introducerea unei grupări electrofile, reactivă faţă de enzimă. Astfel se obţin derivaţi activi de celuloză care se pot folosi atât pentru legare ionică cât şi pentru legare covalentă.

Dextranul este un polizaharid, în general liniar, solubil în apă, compus din resturi de α-D-glucoză legate α-1,6. Pentru a obţine suporturi insolubile, poroase, ele trebuie reticulate, în general cu epiclorhidrină.



Epiclorhidrină

Produsul reticulat este apoi activat, cel mai folosit reactiv de activare fiind bromcianul (BrCN), dar se utilizează şi clorură de cianuril, benzochinonă sau epiclorhidrină.

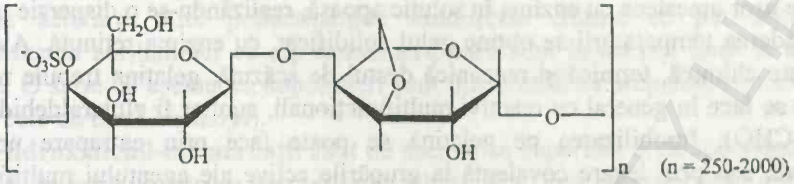
Agarul şi agaroza (sau agarul fracţionat) sunt foarte mult utilizate. Din punct de vedere chimic sunt D-galactani izolaţi din unele alge roşii, care formează geluri rigide dacă soluţiile lor sunt răcite sub 45°C. Gelurile de agaroză sunt suporturi macroporoase hidrofile şi neadsorbante. Sunt rezistente la degradare microbiană, sunt stabile mecanic şi au pori mai mari decât alte geluri. Au însă şi unele dezavantaje:

- Nu pot fi sterilizate termic
- Se dezintegrează în soluţii alcaline puternice şi în solvenţi organici
- Se deformează ireversibil la uscare

Proprietăţile mecanice şi chimice pot fi îmbunătăţite prin reticulare cu reactivi bifuncţionali, cum ar fi epiclorhidrina, 2,3-dibrompropanol sau divinilsulfonă (CH_2=CH–SO_2–CH=CH_2). Agaroza reticulată macroporoasă este un excelent suport, dar se utilizează mai ales în scopuri analitice, fiind prea scump pentru scopuri industriale. Comparativ, agarul brut este ieftin, însă conţine grupări carbonil şi sulfat care influenţează nefavorabil proprietăţile lui.

Alginatul este o altă polizaharidă provenită din alge (alge brune). Gelurile de tip alginat se pot obţine în prezenţa Ca^{2+} sau a altor ioni polivalenţi. Enzimele pot fi imobilizate prin entrapare sau prin legare la suprafaţa gelului după activarea acestuia cu carbodiimidă (HN=C=NH) sau hidrazină (H_2N-NH_2). Alginaţii sunt stabili în domeniul de pH 5-10. Acizii concentraţi şi temperaturile înalte provoacă însă decarboxilarea lor. De asemenea se pot degrada oxidativ.

κ-Caragenanul este o denumire generică pentru polizaharidele naturale cu structură de galactani extrase din alge roşii, care sunt constituite din unităţi de galactoză ce se găsesc parţial în formă anhidro şi sunt parţial esterificate cu acid sulfuric.



κ-Caragenan

Proprietăţile caragenanului sunt foarte asemănătoare cu ale alginatului şi agarozei. Pentru obţinerea gelului, soluţia de κ-caragenan sub formă de sare metalică este picurată într-o soluţie de reactant de gelifiere, cum ar fi clorură de potasiu, la temperatura camerei (Tosa ş.a., 1979). Diferiţi cationi cum ar fi amoniu, calciu şi aluminiu servesc de asemenea ca buni reactanţi de gelifiere. Aceste geluri sunt instabile în prezenţa ionilor de sodiu sau la pH scăzut, însă sunt foarte stabile la pH mai mare de 4,5. Rigidizarea gelurilor cu glutaraldehidă şi hexametilendiamină adesea stabilizează biocatalizatorii entrapaţi în geluri de κ-caragenan.

Chitina şi chitosanul sunt polizaharide care conţin grupări aminice. Din punct de vedere chimic, chitina este o polizaharidă constituită din unităţi de 2-acetamido-2-deoxi-β-D-glucoză, legate 1,4. Aproximativ o asemenea unitate din şase nu este acetilată, în timp ce în chitosan practic nici o grupare amino nu e acetilată, acesta fiind constituit aşadar din unităţi de 2-amino-2-deoxi-D-glucoză. Chitina este un produs secundar care se obţine în cantităţi mari la fabricarea acidului citric şi antibioticelor pe cale fermentativă, cât şi din animale marine. Chitosanul este solubil în apă şi se poate obţine din chitină prin dezacetilare în soluţii concentrate de NaOH. Ele au avantajul de a fi suporturi ieftine. Imobilizarea enzimelor se poate face prin adsorbţie, dar aceasta este în general urmată de înreţelare cu glutaraldehidă. Chitosanul în formă solubilă se poate amesteca cu soluţia de enzimă şi amestecul rezultat poate fi gelifiat fie prin adăugare de glutaraldehidă, fie de un contra-ion polianionic: $Fe(CN)_6^{4-}$, polifosfat, etc.

Suporturi de tip proteic

Din această categorie se utilizează cele care nu au funcţii catalitice. Ele au avantajul caracterului hidrofil şi a uşurinţei manipulării lor, însă stabilitatea chimică, termică şi mecanică poate lăsa de dorit şi sunt sensibile la atacuri microbiene.

Colagenul este proteina cea mai abundentă la vertebratele superioare. Printre avantajele utilizării sale se numără hidrofilicitatea, care facilitează accesul enzimei la

locurile de legare. Legarea enzimelor de suporturile de colagen se poate face prin adsorbție fizică, complexare chimică, entrapare și legare covalentă. Colagenul poate fi reticulat la nevoie, obținând suporturi cu rezistență mecanică mai mare și porozitate controlată.

Gelatina se obține din colagen prin fierbere în apă. Datorită naturii hidrofile, se poate ușor amesteca cu enzima în soluție apoasă, realizându-se o dispersie uniformă. Prin scăderea temperaturii se obține gelul solidificat, cu enzima reținută. Având însă stabilitate chimică, termică și mecanică destul de scăzută, gelatina trebuie reticulată, ceea ce se face în general cu reactivi multifuncționali, cum ar fi glutaraldehida ($HCO-(CH_2)_3-CHO$). Imobilizarea pe gelatină se poate face prin entrapare urmată de reticulare, sau prin legare covalentă la grupările active ale agentului multifuncțional (carbonil în cazul glutaraldehidei).

Albumina se poate utiliza asemănător cu gelatina, necesitând reticulare, de exemplu cu glutaraldehidă. Cea mai ieftină este cea din albușul de ou.

Suporturi din materiale tip carbon

Cărbunele activ reprezintă un suport mult utilizat pentru imobilizarea enzimelor, având o porozitate ridicată și o suprafață internă a porilor foarte mare. Rezistența mecanică este comparabilă cu cea a materialelor pe bază de sticlă. Este stabil termic, în condițiile imobilizării și utilizării enzimei și inert la atacul microorganismelor. Activarea cărbunelui se face la temperaturi înalte cu O_2, CO_2, vapori de apă sau diverși compuși chimici, când se obțin pe suprafață grupări carboxilice, vinilice, fenolice, etc. Majoritatea imobilizărilor pe cărbune activ se fac prin adsorbție, dar au fost realizate și legări covalente.

3.2.1.2. Suporturi sintetice polimere

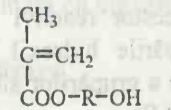
Sunt disponibile pentru imobilizarea enzimelor într-o varietate mult mai mare decât cele naturale. Dintre avantajele lor amintim inerția la atacul microbian și posibilitatea obținerii unei structuri dorite a polimerului, fie prin copolimerizare, fie prin grefarea ulterioară a unor grupări funcționale pe suportul polimer. Printre cei mai utilizați polimeri sintetici sunt (Kennedy și Cabral, 1987):

Polistirenul a fost primul polimer sintetic utilizat pentru imobilizare de enzime, în 1953. Cel mai important derivat de polistiren este poliamino-polistirenul, obținut din polistiren prin nitrare și reducere. Deoarece are o activitate relativ scăzută în reacția de cuplare cu enzimele, acest compus a fost activat prin diazotare, carbonilare sau prin reacție cu tiofosgen. Mai are un dezavantaj, hidrofobicitatea matricei polimere, care determină obținerea unor randamente de cuplare scăzute cu enzima. Acest dezavantaj poate fi eliminat prin copolimerizare cu acid acrilic sau metacrilic, care au o hidrofilicitate mult mai pronunțată.

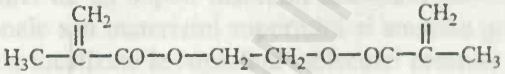
BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Poliacrilamidele şi derivaţii lor (acrilamidă $H_2C=CH-CONH_2$) se utilizează foarte mult datorită caracterului lor hidrofil. Polimerii liniari sunt solubili în apă. Ei pot fi insolubilizaţi prin înreţelare cu reactivi bifuncţionali, cum ar fi *N,N'*-metilen-bisacrilamida ($H_2C=CH-CO-NH-CH_2-NH-CO-CH=CH_2$). Reţelele poliacrilamidice pot fi utilizate ca atare pentru entraparea enzimelor, însă pot fi şi activate cu diferiţi agenţi de activare. Alte poliacrilamide modificate chimic se pot obţine prin copolimerizarea acrilamidei cu alţi monomeri, care sunt în acelaşi timp şi agenţi de reticulare. O serie de asemenea copolimeri sunt disponibili ca preparate comerciale (de exemplu cele de tipul *Enzacryl*).

Hidroxialchil-metacrilaţii sunt de asemenea suporturi organice hidrofile care corespund, datorită grupărilor hidroxil, polizaharidelor, însă au proprietăţi mecanice şi rezistenţă biologică mult mai bune. Se obţin sub formă de perle prin copolimerizarea în suspensie a hidroxialchil-metacrilatului cu un agent de reticulare. Cel mai utilizat este copolimerul 2-hidroxietil-metacrilatului cu etilen dimetacrilat.



R = alchil



etilen dimetacrilat

Aceşti polimeri se pot obţine şi în forme modificate prin modificarea chimică directă a copolimerului sau copolimerizare cu alţi monomeri ce conţin grupări reactive sau precursori ai unor grupări funcţionale reactive.

Poliamidele, cunoscute sub denumirea de Nylon, sunt obţinute prin policondensarea acizilor α,ω-dicarboxilici cu α,ω-diamine, diferind între ele prin numărul de grupări metilen care se repetă în structură. Se pot obţine într-o varietate de forme: fibre, membrane, tuburi, pudră. Întrucât pentru legare covalentă cu enzimele nu sunt disponibile decât grupările terminale, pentru creşterea capacităţii de legare se utilizează diferite metode de intercalare în structura polimerului a unor grupări active.

3.2.2. Suporturi anorganice

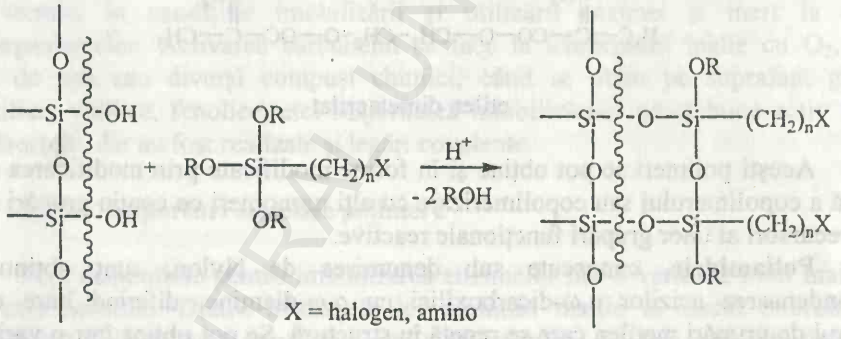
Deşi suporturile organice sunt preferate în general pentru imobilizarea enzimelor, având o reactivitate chimică mult mai mare, suporturile anorganice prezintă, datorită proprietăţilor lor fizice, unele avantaje, mai ales pentru utilizarea industrială:

- rezistenţă mecanică ridicată
- stabilitate termică

- stabilitate în domeniu larg de pH
- rezistență la solvenți și atac microbian
- timp de viață lung
- regenerabilitate ușoară prin piroliză

Suporturile anorganice se clasifică în suporturi minerale și sintetice (Kennedy și Cabral, 1987). Suporturi minerale sunt bentonita, piatra ponce, hornblenda, nisipul, diatomita (kieselgur), cleiurile de attapulgit. Dintre suporturile sintetice, cele mai importante sunt: sticla cu pori controlați, materialele pe bază de silice poroasă, bioxidul de titan poros, alumina poroasă, diferiți oxizi metalici (fier, nichel) cu pori controlați, metale (oțel inoxidabil), aluminosilicați (ceramică).

Suprafața celor mai multe suporturi anorganice conține grupări oxidice sau hidroxilice, care nu sunt destul de reactive pentru legarea enzimelor. Din acest motiv ele în general se derivatizează, cel mai bine prin metoda silanizării cu derivați trialcoxisilanici ce conțin o grupă funcțională organică (amină alifatică sau aromatică, halogen, aldehidă, acetal). Cuplarea acestor reactivi de suport se realizează prin interacțiunea resturilor alcoxi cu grupările hidroxil sau cu suprafața oxidată a suportului. Astfel, reacția de derivatizare a grupărilor silanolice de pe suprafața sticlei poroase duce la formarea de legături Si-O-Si.



În unele cazuri, suporturile silanizate pot reacționa direct cu enzima, însă în general grupările organice sunt modificate pentru a obține derivați cu activitate mai mare. Cel mai utilizat agent de derivatizare silanic este 3-aminopropil-trietoxi-silanul.

Sticla cu pori controlați este cel mai important suport anorganic. Aceasta se fabrică prin încălzirea unor sticle de tip borosilicat la 500-700°C, pentru perioade lungi de timp, urmată de spălarea acidă a componentei borat, rezultând o structură poroasă cu conținut de silicat foarte ridicat. Se pot realiza particule de sticlă de diferite dimensiuni, cu o distribuție foarte îngustă a porilor în domeniul 4,5 ÷ 400 nm. Sticla cu pori controlați are stabilitate mare la solvenți organici, dar este instabilă la pH>8, ceea ce limitează aplicabilitatea ei. Pentru a diminua acestă deficiență, se practică acoperirea

sa cu oxizi metalici, prin impregnare la vid cu o soluție a sării metalului respectiv (în principal zirconiu), urmată de calcinare. Sticla poroasă mai are și dezavantajul prețului ridicat, în timp ce alte suporturi: ceramica cu pori controlați, alumina, etc. s-au dovedit a fi mai ieftine. Mineralele naturale poroase au însă dezavantajul că distribuția porilor este prea largă.

Materialele pe bază de silice poroasă obținute prin tehnica de sol-gel au dobândit o importanță crescândă pentru imobilizarea enzimelor în ultimii ani, deși ele sunt cunoscute de aproximativ 200 de ani. Structura de bază a acestor materiale este de SiO_2, dar ele pot conține o serie de alți compuși, de exemplu pot fi de tipul TiO_2-SiO_2 sau $3Al_2O_3$-$2SiO_2$. Se pot prezenta sub formă de sticlă sau ceramică, forma lor fiind determinată de condițiile tehnologice în care au fost obținute (Hench și West, 1990). Importanță deosebită pentru imobilizarea enzimelor au materialele compozite hibride pe bază de silicagel poros care conțin grupări funcționale organice (Pierre, 2004). Ele se pot folosi pentru imobilizarea enzimelor mai ales prin entrapare, dar este posibilă și adsorbția, sau entraparea combinată cu adsorbția.

3.3. Metode de imobilizare

Atașarea enzimei de un suport insolubil înseamnă stabilirea unor interacțiuni între grupările funcționale sau materialul suportului și anumite grupări funcționale ale enzimei, în general cele localizate la suprafața moleculei proteice. Alegerea suportului și a metodei de imobilizare trebuie făcute cu foarte mare grijă, pentru a nu afecta centrul activ al enzimei. Acesta este de fapt format din două zone sau situsuri având funcțiuni diferite: *centrul catalitic* ce participă la reacție și *centrul de legare* care controlează specificitatea de substrat a enzimei. Pentru ca enzima să-și păstreze activitatea catalitică după imobilizare, este important ca structura terțiară de bază a acestor centre să nu fie afectată. Aceasta înseamnă că trebuie cunoscute grupările funcționale ce intră în componența centrului activ, legăturile pe care aceștia le pot forma și compușii care le pot bloca. De asemenea, imobilizarea trebuie făcută în condiții blânde (menajante) și foarte bine controlate. Astfel, trebuie evitate reacțiile la temperaturi mari sau în condiții de pH acide sau bazice puternice.

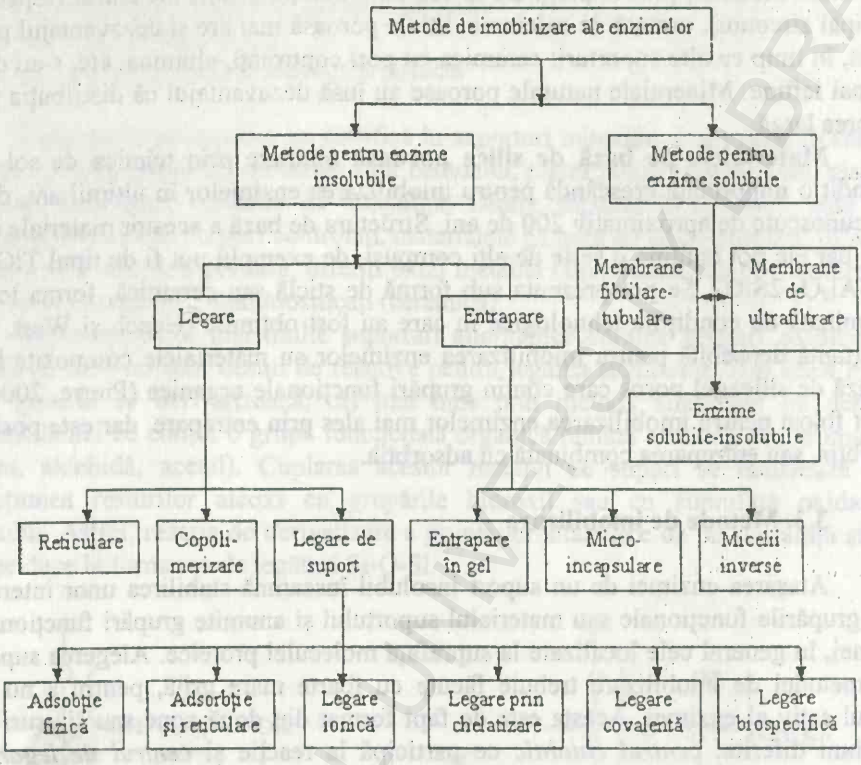


Figura 3.2. Clasificarea metodelor de imobilizare ale enzimelor

O altă problemă ce poate să apară este ca centrul activ să nu fie afectat, în schimb accesul substratului la acest centru să fie blocat sau îngreunat. Din aceste motive, în general alegerea celei mai bune metode de imobilizare se face experimental. O clasificare mai cuprinzătoare a metodelor de imobilizare ale enzimelor (Figura 3.2) ține cont atât de posibilitatea insolubilizării lor cât și de cea de a le reține în interiorul reactorului cu ajutorul unei membrane de ultrafiltrare. Această a doua metodă este considerată de unii autori de asemenea imobilizare, deși enzima rămâne în formă solubilă, însă într-un spațiu limitat (Prenosil ș.a. 1989).

3.3.1. Imobilizarea prin legare de suport

Este cea mai veche metodă de imobilizare a enzimelor. Pentru a realiza o imobilizare eficientă, este necesară o selecție atentă a suportului și a metodei de legare de suport. Cantitatea de enzimă fixată pe suport și activitatea după imobilizare depind

în mare măsură de natura suportului. Cu toate că natura suportului ales depinde de însăşi natura enzimei, totuşi alegerea trebuie efectuată ţinând cont şi de următoarele caracteristici:

- mărimea particulelor suportului
- suprafaţa specifică
- raportul molar dintre grupările hidrofile şi cele hidrofobe
- compoziţia chimică

Proteinele enzimatice au în strucura lor grupări reactive, grupări cu caracter ionic, grupări hidrofobe, sau domenii hidrofobe. Aceste grupări provenite din aminoacizii constituenţi, cât şi domeniile hidrofobe pot participa la imobilizarea enzimei prin adsorbţie fizică, legare ionică sau legare covalentă. Suporturile insolubile pot fi utilizate pentru legarea enzimelor fie ca atare, fie după modificarea chimică sau activarea lor. La modul general, creşterea proporţiei de grupări hidrofile şi a suprafeţei specifice duce la creşterea cantităţii de enzimă legată pe unitate de suport, rezultând o activitate mai mare a enzimei imobilizate.

Suporturile cele mai mult utilizate sunt derivaţii de polizaharide ca celuloză, dextran, agaroză, cât şi gelurile de poliacrilamidă. Multe asemenea suporturi sunt comercializate sub diverse denumiri ca Sephadex (derivaţi de dextran), Sepharose (derivaţi de agaroză), Bio-Gel (poliacrilamidă), etc. Imobilizarea prin legare de suport se poate face în trei variante, în funcţie de modul de fixare a enzimei.

3.3.1.1. Adsorbţia fizică

Aşa cum arată şi numele, această metodă se bazează pe adsorbţia fizică a enzimei pe suprafaţa suportului insolubil, materialul suportului nefiind în general funcţionalizat specific. Biocatalizatorii se pot fixa pe suport prin interacţiuni fizice cum ar fi legături de hidrogen, interacţiuni hidrofobe, forţe Van der Waals, sau combinaţii ale acestora. Suporturile utilizate sunt mai ales de natură anorganică, dar se folosesc şi polimeri sintetici sau materiale organice naturale, cum este chitosanul cu micropori de mărime controlată. Important este ca aceste materiale să aibă o capacitate de adsorbţie ridicată. Pentru stabilizarea enzimei adsorbite se pot folosi metode ca adsorbţia urmată de înreţelare cu glutaraldehidă. Metoda adsorbţiei fizice este foarte utilă şi pentru imobilizarea celulelor. În anumite condiţii, suporturile pot fi regenerate.

Adsorbţia nu determină în general modificări conformaţionale ale proteinei enzimatice sau distrugerea centrului activ. Aşadar, cu condiţia găsirii unui suport adecvat, această metodă este simplă şi eficientă. Dezavantajul principal acestei metode este tăria redusă a interacţiunii dintre suport şi enzimă, care face ca aceasta să fie afectată de condiţiile de mediu în care se face utilizarea biocatalizatorului imobilizat, cum ar fi temperatura sau concentraţia reactanţilor. Drept urmare, enzima imobilizată se poate desorbi uşor.

Adsorbţia enzimei depinde de următorii factori:

- pH-ul
- natura solventului
- tăria ionică
- concentrația enzimei și a suportului solid
- temperatura

Dintre acestea, o importanță majoră are concentrația de enzimă raportată la unitatea de suprafață a suportului solid, activitatea enzimei imobilizate crescând cu creșterea concentrației enzimei până la o valoare de saturație, după care scade.

Temperatura are de asemenea un rol important, mai ales în cazul structurilor poroase, când difuzia devine un factor esențial. Timpul de imobilizare este mai scurt dacă temperatura este mai ridicată, însă o temperatură mult prea mare poate duce la denaturarea enzimei.

Tabelul 3.2. Exemple de enzime imobilizate prin adsorbție fizică

Tipul suportului	Tipul enzimei
Amidon	α-Amilază
Cărbune activ	Glucozoxidază
	α-Amilază
	β-Amilază
	Glucoamilază
	Invertază
Alumină	Glucoamilază
Bentonită	Invertază
Sticlă poroasă	Glucozoxidază
	Lipază
	Papaină

Suporturile cele mai utilizate pentru imobilizarea prin adsorbție fizică sunt: alumina, cărbunele activ, sticla poroasă, diatomita, silicagelul, hidroxiapatita, bentonita. Se poate remarca faptul că ele sunt în cea mai mare parte materiale anorganice. Câteva exemple de enzime care au fost imobilizate prin această metodă sunt redate în Tabelul 3.2 (Chibata, 1978).

Lipazele reprezintă o clasă de enzime pentru care imobilizarea prin adsorbție fizică poate constitui o modalitate pentru creșterea activității și selectivității. Acest lucru se datorește fenomenului cunoscut de activare a lipazelor în prezența unor interfețe hidrofobe, care a fost observat încă din 1958 (Sarda și Desnuelle, 1958). Ele suferă niște modificări conformaționale care determină creșterea spectaculoasă a activității. Adsorbția pe un suport hidrofob, cum sunt multe dintre suporturile utilizate pentru imobilizări, va determina așadar interacțiunea puternică a suprafeței hidrofobe cu domeniul hidrofob al lipazei și o funcționalitate crescută a enzimei. Dacă suportul este modificat prin atașarea unor grupări care îi măresc hidrofobicitatea, creșterea

activității este și mai însemnată. Astfel, suportul de octil-agaroză, accesibil comercial, se obține prin atașarea unor grupări octil pe suprafața agarozei hidrofile. O serie de lipaze adsorbite pe acest suport au demonstrat o activitate mult mai mare decât cea a lipazei libere așa cum se observă din Tabelul 3.3. (Fernandez-Lafuente ș.a., 1998).

Tabelul 3.3. Activitățile relative, față de lipaza liberă corespunzătoare, ale lipazelor adsorbite pe octil-agaroză în reacția de hidroliză a p-nitrofenil-palmitatului.

Sursa lipazei	Activitatea relativă (%)
Candida rugosa	110
Candida antarctica	200
Humicola lanuginosa	2000
Rhizomucor miehei	700
Pseudomonas fluorescens	150
Rhizopus niveus	600
Pancreas de porc	300

Imobilizarea enzimelor prin adsorbție fizică se poate face și utilizând suporturi care au legate covalent niște grupări cu afinitate pentru o anumită categorie de compuși. Un astfel de suport este Concanavalin A - Sepharose, care utilizează ca suport de bază un anumit tip de agaroză (Sepharose) de care este legată covalent prin intermediul bromcianului concanavalina A, care este o proteină (lectină). Această proteină are proprietatea de a reacționa reversibil cu anumite resturi specifice de zaharide (D-glucoză, D-manoză). Concanavalin A- Sepharose se poate deci utiliza pentru imobilizarea așa-numitelor glicoenzime (invertază, amiloglucozidază, celobiază, etc.) care conțin asemenea grupări (Woodward, 1985).

Ca tehnică de lucru, există mai multe procedee de imobilizare a enzimelor prin adsorbția fizică, dintre care importanță practică prezintă două:

1. în coloană;
2. în reactorul cu agitare.

Procedeul în coloană se poate realiza în două moduri:

a. soluția enzimatică este aplicată în partea superioară a coloanei care conține suportul și o părăsește la baza ei, în flux continuu. Este recomandabil ca aceste coloane să fie termostatate.
b. procedeul în pat fluidizat, care presupune intrarea soluției enzimatice la baza coloanei, iar particulele de suport sunt menținute în continuă mișcare de curentul de lichid ce conține enzima.

Procedeul în reactorul cu agitare este tehnica cea mai utilizată și presupune agitarea un anumit timp a suportului împreună cu soluția enzimatică. Această metodă dă rezultate bune, mai ales în ce privește uniformitatea suportului obținut. Astfel, lipazele se pot adsorbi pe suporturi de tip Celite, prin agitarea suportului suspendat în soluția de enzimă la temperatura camerei, eficiența adsobției fiind dependentă de pH-ul

şi tăria ionică a soluţiei tampon utilizate (Akova şi Ustun, 2000). O variantă a acestei metode este precipitarea forţată a enzimei pe suport, de exemplu prin adăugare de acetonă, la rece. În acest fel se obţine o eficienţă mai mare a imobilizării şi, chiar dacă nu toată enzima este adsorbită, acest preparat se poate folosi cu succes pentru realizarea unor reacţii în solvenţi organici în care enzima nu este solubilă şi drept urmare nu se va desprinde de suport. Astfel, lipaza din *Pseudomonas* sp. a fost precipitată pe un suport de $CaCO_3$ şi enzima astfel imobilizată s-a dovedit a fi foarte eficientă în reacţia de obţinere a monogliceridelor prin gliceroliza uleiului de măsline (Roşu ş.a., 1997).

Un alt suport utilizat pentru imobilizarea lipazei prin adsorbţie fizică a fost copolimerul stiren-divinilbenzen (45% divinilbenzen). Rezultate mai bune s-au obţinut dacă polimerul a fost lăsat să se umfle în heptan, apoi s-a adăugat enzima solidă şi s-a agitat la temperatura camerei timp de 2 ore. Această metodă a dus la obţinerea unei enzime cu stabilitate operaţională mai mare comparativ cu cea în care adsorbţia s-a efectuat în mediu apos (de Oliveira, Alves şi de Castro, 2000).

Este interesant faptul că şi poliacrilamida înreţelată cu N,N'-metilen-*bis*-acrilamidă a fost utilizată ca suport pentru imobilizarea unor enzime hidrolitice prin adsorbţie, chiar dacă ea este cunoscută pentru posibilitatea de a fixa enzimele prin entrapare. În cazul lipazei din *Candida antarctica*, s-a obţinut în cazul depunerii pe această poliacrilamidă o activitate specifică mai mare decât în cazul depunerii pe Celite (Triantafyllou ş.a., 1997).

3.3.1.2. Legarea ionică

Ca şi adsorbţia fizică, este o metodă simplă de imobilizare a enzimelor. Se bazează pe legarea ionică a proteinei enzimatice pe un suport insolubil ce conţine grupări schimbătoare de ioni. În unele cazuri, legarea se realizează nu numai prin legarea ionică ci şi prin adsorbţie fizică. Principala diferenţă între adsorbţia fizică şi legarea ionică constă în tăria legăturii dintre enzimă şi suportul solid. Interacţiunile ion-ion care apar în cazul legăturii ionice sunt mai puternice decât cele care se stabilesc prin adsorbţie fizică.

Această metodă a fost utilizată pentru prima oară la imobilizarea catalazei pe celuloză cu grupări schimbătoare de ioni (Mitz, 1956). Este avantajoasă datorită faptului că este foarte simplă, suporturile sunt reutilizabile, iar enzima nu suferă modificări în timpul procesului. Fixarea enzimei pe suport se realizează în condiţii blânde comparativ cu cele necesare pentru legarea covalentă. Legarea ionică nu produce sau produce doar mici modificări conformaţionale la nivelul centrului activ al enzimelor, ceea ce determină obţinerea unor enzime imobilizate cu retenţie mare a activităţii în majoritatea cazurilor.

Pe de altă parte, forţele de legătură fiind mai slabe decât în cazul legării covalente, se poate produce desorbţia enzimei în cazul unor soluţii de substrat având

tărie ionică ridicată, sau la variații de pH. Legarea enzimei de suport este influențată de tipul soluției tampon utilizate, pH, tărie ionică și temperatură.

În majoritatea cazurilor, suporturile utilizate sunt de natură organică, mai ales polizaharide și polimeri sintetici, având grefate grupări schimbătoare de ioni, dar ele pot fi și de natură anorganică, în special silice, având grupe schimbătoare de ioni, aceleași sau asemănătoare ca cele organice. În conformitate cu tipul grupărilor schimbătoare de ioni, aceste suporturi se pot clasifica drept *cationiți*, când pot schimba cationi ca Na^+, H^+, etc. cu grupările cationice ale enzimei și *anioniți*, când realizează schimbarea unor anioni ca OH^-, Cl^- ale suportului cu grupările anionice ale enzimei.

Suporturile de tip cationit conțin grupări sulfat SO_4^{2-}, fosfat PO_4^{3-}, carboxil COO^-, iar cele de tip anionit, grupări aminice, guanidinice sau aminice cuaternare (aminoetil AE , dietilaminoetil DEAE, trietilaminoetil TEAE).

$H_3N^+-CH_2-CH_2-$	$(CH_3CH_2)_2NH^+-CH_2-CH_2-$	$(CH_3CH_2)_3N^+-CH_2-CH_2-$
aminoetil (AE)	dietilaminoetil (DEAE)	trietilaminoetil (TEAE)

Exemple de suporturi uzuale pentru acest tip de imobilizare sunt derivații de celuloză, Sephadex-ul, cât și diverse rășini sintetice schimbătoare de ioni (Tabelul 3.4).

Tabelul 3.4. Schimbători de ioni comerciali folosiți pentru legarea ionică a enzimelor (Chibata, 1978).

Anioniți	**Tipul enzimei imobilizate**	**Cationiți**	**Tipul enzimei imobilizate**
DEAE-Cellulose	Invertază Catalază Glucoamilază Aminoacilază Protează	CM-Cellulose	Tripsină Chimotripsină Invertază
TEAE-Cellulose	Aminoacilază Aspartază	P-Cellulose (Celuloză Fosfat)	Tripsină Chimitripsină
DEAE-Sephadex	Aminoacilază Aspartază	Amberlite CG-50	Glucozoxidază Glucoamilază
Poliaminopolistiren Amberlite IR-45	Catalază Glucoamilază Invertază	Amberlite IR-120	Invertază

Un exemplu tipic de imobilizare prin legare ionică este cea a aminoacilazei fungice, care catalizează hidroliza enantioselectivă a derivaților *N*-acilați ai unor aminoacizi. Procedura de imobilizare este foarte simplă. Drept suport se poate folosi DEAE Sephadex, care se agită cu o soluție de aminoacilază dizolvată în tampon fosfat

0,1M de pH 7 timp de 3 ore la temperatura camerei, după care se lasă să stea 16 ore şi se filtrează (Chibata ş.a., 1974). Acest procedeu a reprezentat prima aplicare industrială a unei enzime imobilizate.

Lipaza din *Pseudomonas sp.* imobilizată pe DEAE-Sephadex nu s-a dovedit a fi la fel de activă ca cea adsorbită pe Celite 545 în reacţia de interesterificare a tricaprilinei cu trilinoleina, însă a demonstrat o retenţie mai bună a activităţii după mai multe cicluri de refolosire, confirmând tăria mai mare a legăturii stabilite între suport şi enzimă (Lee şi Akoh, 1998).

În unele cazuri s-a raportat realizarea legării ionice după creşterea încărcării electrice a proteinei enzimatice prin modificarea ei chimică (Solomon şi Levin, 1974). Astfel, glucoamilaza, având caracter slab anionic a fost transformată într-un derivat polianionic prin legare covalentă cu un copolimer solubil în apă al etilenei cu anhidrida maleică. Enzima polianionică rezultată s-a imobilizat prin legare ionică pe suporţi de tip anionit ca DEAE Cellulose şi enzima imobilizată a fost mult mai stabilă decât cea obţinută cu enzima nemodificată, dovedind că legarea de tip ionic de suport a fost mai puternică.

3.3.1.3. Legarea covalentă

Acest tip de imobilizare se bazează pe formarea unor legături covalente între enzimă şi suportul insolubil. Resturile de aminoacizi din molecula de enzimă care nu sunt implicate în centrele active sau în centrele de legare ale substraturilor pot fi utilizate pentru formarea de legături covalente cu suportul. Alegerea condiţiilor de imobilizare este mai dificilă decât în cazul celorlalte metode de legare pe suport. Condiţiile de reacţie nu mai sunt blânde şi pot fi uneori destul de complexe. Legătura covalentă ce se formează între enzimă şi suport este puternică, iar preparatele enzimatice obţinute sunt stabile, care nu mai pierd enzima de pe suport nici la tărie ionică ridicată.

Dezavantajele legării covalente sunt:

- structurile active ale enzimelor sunt susceptibile de a fi distruse prin modificarea lor parţială
- interacţiunile putenice dintre moleculele enzimei şi ale suportului de multe ori împiedică libera rotaţie a moleculei de enzimă, ceea ce poate determina scăderea activităţii enzimatice
- este dificilă găsirea condiţiilor optime de imobilizare
- metoda nu se poate aplica pentru imobilizarea de celule
- suporturile nu sunt în general regenerabile.

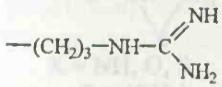
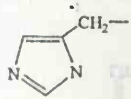
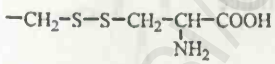
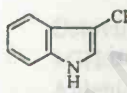
Este foarte important ca aminoacizii esenţiali pentru actul catalitic să nu fie implicaţi în legătura cu suportul. Acest lucru nu este uşor de realizat, însă există anumite metode cum ar fi imobilizarea în prezenţa unui inhibitor competitiv sau a substratului.

Marea diversitate a grupărilor funcționale între care se poate realiza cuplarea face ca să nu avem metode cu aplicabilitate generală pentru imobilizarea enzimelor prin legare covalentă. Alegerea metodei potrivite trebuie făcută pentru fiecare caz în parte, ținând cont de următoarele elemente:

- grupările funcționale ale enzimei ce pot da legături covalente în condiții relativ blânde
- tipurile de reacții de cuplare posibile între enzimă și suport
- tipurile de suporturi funcționalizate potrivite pentru imobilizare

Resturile de aminoacizi din molecula enzimei pot avea în catenele lor laterale diverse grupări funcționale potrivite pentru legarea de suportul solid. Câteva asemenea grupări sunt prezentate în Tabelul 3.5.

Tabelul 3.5. Grupări funcționale ale resturilor de aminoacizi din enzime, disponibile pentru legarea de suportul solid și numărul reacțiilor în care acestea pot participa (Prenosil ș.a, 1989; Kennedy și Cabral, 1987).

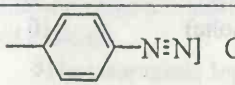
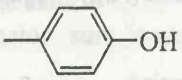
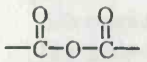
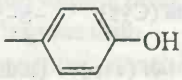
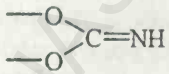
Catena laterală R a aminoacidului	Denumirea aminoacidului	Grupa funcțională reactivă	Număr reacții de imobilizare
-	-	$-NH_2$ (amino terminală)	-
-	-	–COOH (carboxil)	-
$H_2N-(CH_2)_4-$	L-lizină (Lys)	$-NH_2$ (amino)	27
$HS-CH_2-$	L-cisteină (Cys)	–SH (mercapto)	31
$HOOC-CH_2-$	L-aspartat (Asp)	–COOH (β-carboxil)	4
$HOOC-CH_2-CH_2-$	L-glutamat (Glu)	–COOH (γ-carboxil)	4
$HO-C_6H_4-CH_2-$	L-tirozină (Tyr)	–OH (hidroxil fenolic)	16
	L-arginină (Arg)	(guanidil)	6
$H_3C-S-CH_2-CH_2-$	L-metionină (Met)	$-S-CH_3$ (metilmarcapto)	7
	L-histidină (His)	(imidazolil)	13
	L-cistină (Cys)	–S–S– (disulfură)	-
	L-triptofan (Trp)	(indolil)	7
$HO-CH_2-$	L-serină (Ser)	–OH (hidroxil alifatic)	0
$HO-CH(CH_3)-$	L-treonină (Thr)	–OH (hidroxil alifatic)	0

Serina şi treonina sunt considerate prea puţin active pentru a putea participa la imobilizarea prin legare covalentă. Resturile de aminoacid cele mai reactive sunt cele ale L-lizinei, L-cisteinei, L-tirozinei şi L-histidinei, acestea fiind capabile de a da şi cel mai mare număr de reacţii de cuplare. Proteinele conţin în medie 7,0% (Lys), 3,4% (Cys), 3,4% (Tyr) şi respectiv 2,2% (His) din aceste resturi, aşa că vor fi preferate mai ales metodele de imobilizare care realizează reacţii de cuplare cu gruparea ε-amino a lizinei sau cu grupările funcţionale carboxil şi amino terminale care au şi ele o abundenţă relativă mare în molecula enzimei.

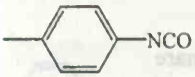
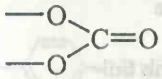
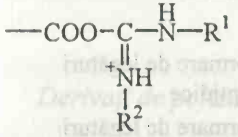
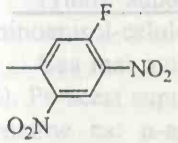
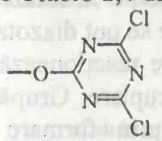
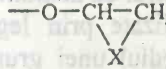
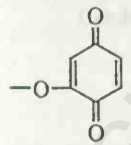
În reacţiile de cuplare covalentă, grupările reactive ale resturilor de aminoacizi trebuie să reacţioneze cu grupările funcţionale reactive ale suporturilor. În practică doar un număr redus de suporturi posedă grupări suficient de reactive pentru cuplarea directă cu enzimele, majoritatea având grupări hidroxilice, aminice, amidice şi carboxilice, care trebuie activate în vederea cuplării. Activarea înseamnă transformarea lor în derivaţi funcţionali cu reactivitate mai mare: diazoniu, izocianat, halogenură, etc. Au fost elaborate o serie de metode experimentale de activare a acestor suporturi.

Reacţiile de cuplare ale enzimelor cu grupările reactive ale suporturilor activate pot fi de trei tipuri: cuplări prin formare de diazoderivaţi, prin formarea unor legături amidice şi prin alchilarea enzimei. Câteva dintre principalele grupări funcţionale ale enzimei şi suportului care pot participa la reacţiile de imobilizare cu formare de legături covalente sunt sintetizate în Tabelul 3.6.

Tabelul 3.6. Grupe funcţionale ale suportului şi enzimei folosite pentru imobilizarea enzimelor prin legare covalentă (Prenosil ş.a., 1989; Kennedy şi Cabral, 1987).

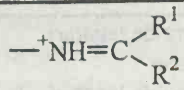
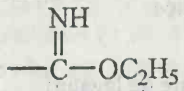
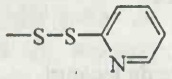
Gruparea reactivă a suportului	Gruparea reactivă a enzimei	Reacţia de cuplare
 Sare de diazoniu	$-NH_2$ $-SH$ 	Diazo cuplare
 Anhidridă acidă	$-NH_2$	Formare de legături peptidice
$-CH_2CON_3$ Acil-azidă	$-NH_2$ $-SH$ 	Formare de legături peptidice
 Imidocarbonat	$-NH_2$	Formare de legături peptidice

Tabelul 3.6. (continuare)

–R–NCS Izotiocianat	$-NH_2$	Formare de legături peptidice
 Izocianat	$-NH_2$	Formare de legături peptidice
$-CH_2COCl$ Clorură de acil	$-NH_2$	Formare de legături peptidice
 Carbonat ciclic	$-NH_2$	Formare de legături peptidice
 O-Acilizouree	$-NH_2$	Formare de legături peptidice
 5-Fluoro-2,4-dinitroanilidă	$-NH_2$	Arilare
 Triazinil	$-NH_2$	Arilare
 X = NH, O, S	$-NH_2$ $-OH$ $-SH$	Alchilare
$-O-(CH_2)_2-SO_2-CH=CH_2$ Vinilsulfonil	$-NH_2$ $-OH$ $-SH$	Alchilare
 Cetovinil	$-NH_2$ $-OH$ $-SH$	Formare de baze Schiff
–CHO Aldehidă	$-NH_2$	

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 3.6. (continuare)

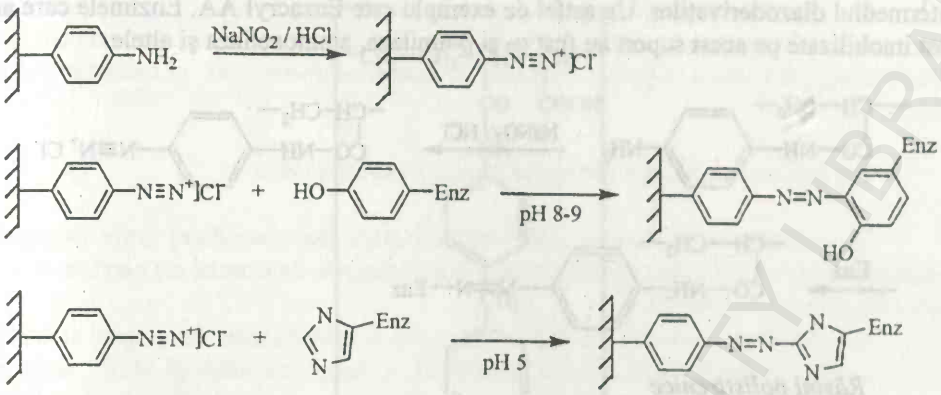
 Imină	–COOH –NH_2	Reacție Ugi
 Imidoester	–NH_2	Amidinare
–CN Cianat	–NH_2	Amidinare
 Rest disulfuric	–SH	Interschimb tiol-disulfură
–NH_2 Amină	–NH_2 –COOH	Formare de legături peptidice
–$CONHNH_2$ Acilhidrazidă	–NH_2 –COOH	Formare de legături peptidice

Legare covalentă prin formare de diazoderivați

Această metodă se bazează pe cuplarea enzimei cu grupările arildiazoniu electrofile ale suportului. Suporturile care au grupări amino aromatice se pot diazota cu acid azotos, cu formarea sărurilor de diazoniu corespunzătoare, care reacționează cu grupările reactive ale enzimei ce sunt capabile de a da reacții de cuplare. Grupările funcționale ale enzimelor care participă la legarea covalentă prin formare de diazoderivați sunt grupele aminice libere, gruparea imidazolică a restului de histidină și mai ales gruparea fenolică a tirozinei. Se obțin enzime imobilizate prin legare covalentă în care legarea enzimei de suport se face prin intermediul unei grupări diazoice.

Suporturile cele mai utilizate pentru această metodă sunt derivații de polizaharide, poliacrilamida, polistirenul, copolimeri pe bază de etilenă-acid maleic și sticla poroasă.

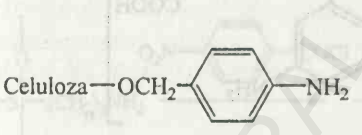
BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



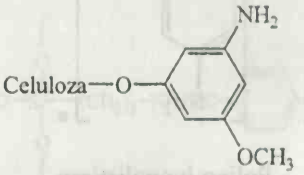
Derivați de polizaharide

Printre suporturile din această categorie se numără: *p*-aminobenzil-celuloza, *m*-aminoanisol-celuloza, *p*-aminobenzoil-celuloza și Sephadex-antranilesterul.

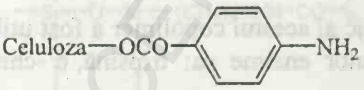
Cea mai mult utilizată este *p*-aminobenzil-celuloza (Liu-Osheroff și Guillory, 1972). Pe acest suport, după transformarea în derivat diazotat, s-au imobilizat o serie de enzime ca: α-amilaza, invertaza, catalaza, tripsina, α-chimotripsina, papaina, aminoacilaza, aspartaza.



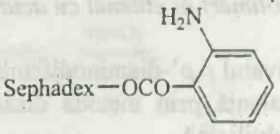
p-Aminobenzil-celuloză



m-Aminoanisol-celuloză



p-Aminobenzoil-celuloză

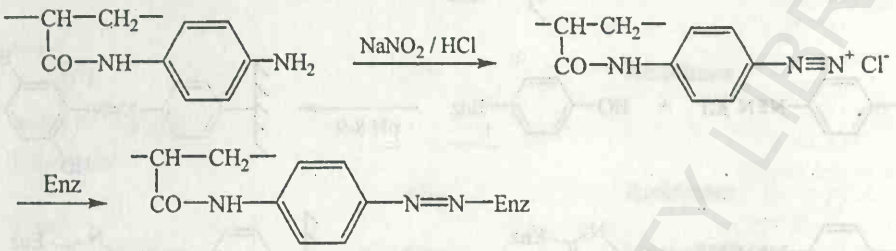


Sephadex-antranilester)

Derivați de poliacrilamidă

Derivații de poliacrilamidă se comercializează sub denumirile de Bio-Gel sau Enzacryl și derivații aminici aromatici ai acestora se pot cupla cu enzimele prin

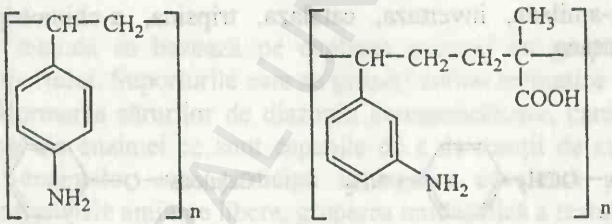
intermediul diazoderivaților. Un astfel de exemplu este Enzacryl AA. Enzimele care au fost imobilizate pe acest suport au fost α- și β-amilaza, aminoacilaza și altele.



Rășini polistirenice

Dintre suporturile de acest tip se pot aminti poliaminopolistirenul și copolimerul metacrilat-*m*-aminostiren.

Pe poliaminopolistiren au fost imobilizate enzime ca ribonucleaza, carboxipeptidaza, lipaza, α-amilaza, pepsina, aminoacilaza etc. Aceste enzime au fost utilizate pentru prima oară în 1953 (Grubhofer și Schleith, 1954) pentru realizarea unor reacții enzimatice în sistem continuu, utilizând coloane umplute cu enzima imobilizată.

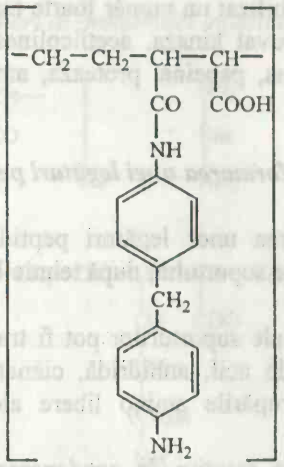


Poliaminopolistiren Copolimer metacrilat-*m*-aminostiren

Copolimeri ai etilenei cu acidul maleic

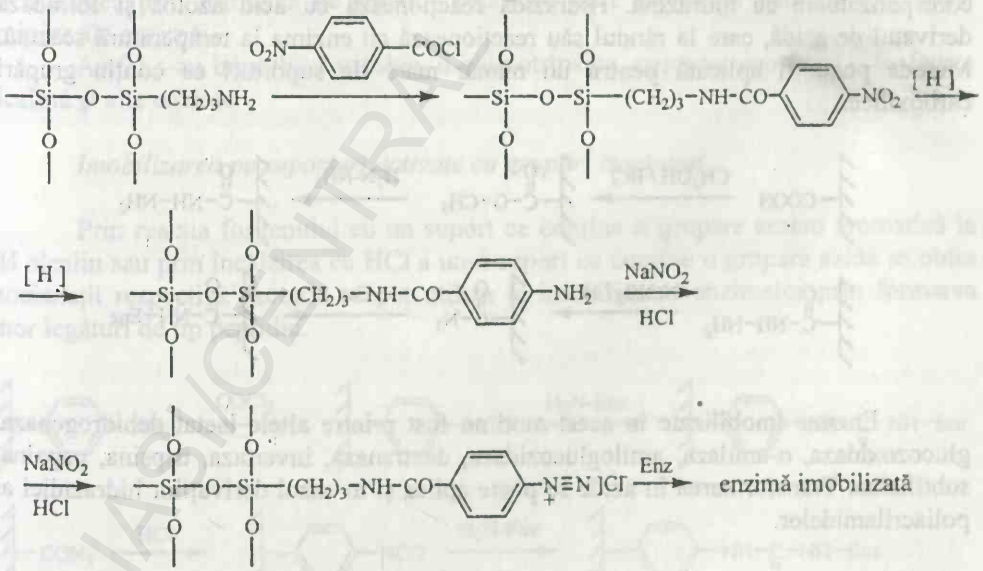
Derivatul *p,p'*-diaminodifenilmetanic al acestui copolimer a fost utilizat pentru legarea covalentă prin metoda diazo a unor enzime ca: tripsină, α -chimotripsină, papainăși subtilizină.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Derivați aminosilanici de sticlă poroasă

Pentru imobilizarea prin legare covalentă cu metoda diazo s-au folosit derivații aminosilanici aromatici de sticlă poroasă. Ei au fost obținuți din derivații 3-aminopropil-trietoxi-silanici de sticlă poroasă prin prin reacție cu clorură de *p*-nitrobenzoil, urmată de reducere, diazotare și cuplare cu enzima (Weetall, 1969). Acest suport este comercializat de firma Corning Glass Works din SUA.



BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pe acest suport s-a imobilizat un număr foarte mare de enzime, dintre care fac parte lactat dehidrogenaza, piruvat kinaza, acetilcolinesteraza, amiloglucozidaza, β-galactozidaza, invertaza, tripsina, papaina, proteaza, aminoacilaza, glucozizomeraza, ureaza.

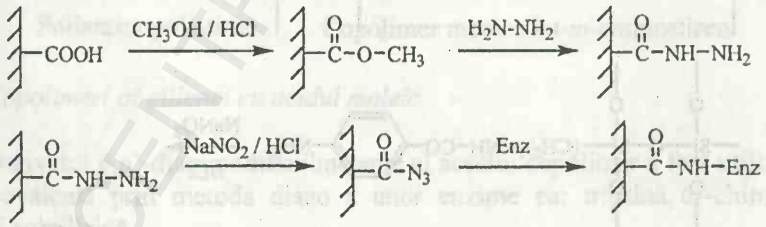
Legare covalentă prin formarea unei legături peptidice

Se bazează pe formarea unor legături peptidice (amidice) între proteina enzimatică şi grupările active ale suportului, după tehnicile de sinteză ale peptidelor. Există două variante posibile:

a. Grupările carboxil ale suporturilor pot fi transformate în grupări reactive ca azidă, clorură de acil, anhidridă, cianat, izocianat şi aceşti derivaţi reacţionează cu grupările amino libere ale enzimei, formând legături peptidice.
b. Prin utilizarea unor reactivi de condensare cum ar fi carbodiimida, se realizează legături peptidice între grupările carboxil sau amino libere ale enzimei şi grupările amino sau carboxil ale suportului insolubil.

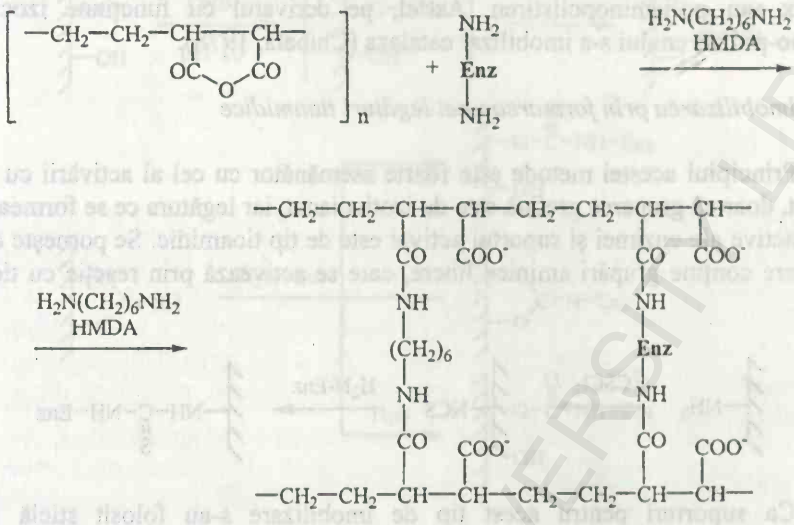
Imobilizarea pe derivaţi de azide de acizi

Această metodă este utilizată pentru sinteza peptidelor, însă se poate aplica şi pentru imobilizări de enzime (Brümmer ş.a, 1972). De exemplu, carboximetil-celuloza poate fi transformată în esterul său metilic, care este convertit în hidrazida corespunzătoare cu hidrazină. Hidrazida reacţionează cu acid azotos şi formează derivatul de azidă, care la rândul său reacţionează cu enzima la temperatură scăzută. Metoda poate fi aplicată pentru un număr mare de suporturi ce conţin grupări carboxilice.



Enzime imobilizate în acest mod au fost printre altele lactat dehidrogenaza, glucozoxidaza, α-amilaza, amiloglucozidaza, dextranaza, invertaza, tripsina, papaina, subtilizina. Transformarea în azide se poate aplica şi în cazul derivaţilor hidrazidici ai poliacrilamidelor.

Imobilizarea pe copolimeri ai anhidridei maleice

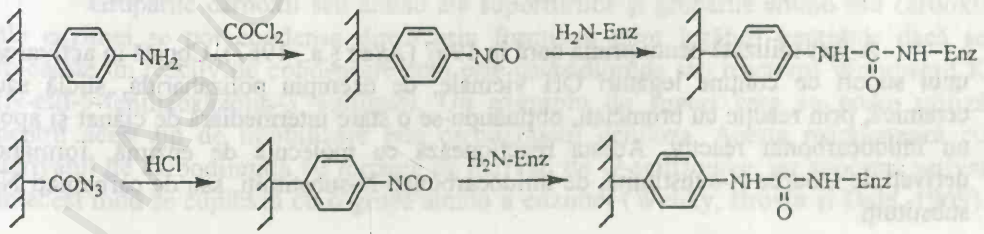


Copolimerii anhidridei maleice cu etilenă, stiren, butandiol-divinileter, izobutil-vinil-ester şi alţi compuşi au fost utilizaţi pentru imobilizarea multor enzime (Chibata, 1978). De exemplu, prin reacţia enzimei cu copolimerul anhidridei maleice cu etilena, în prezenţa hexametilendiaminei care are rol de agent de reticulare, are loc imobilizarea prin formarea de legături peptidice între anhidrida maleică şi grupele aminice ale enzimei.

Astfel s-au imobilizat tripsina, α-chimotripsina, papaina, subtilizina, fosfataza alcalină şi alte enzime.

Imobilizarea pe suporturi activate cu grupări izocianat

Prin reacţia fosgenului cu un suport ce conţine o grupare amino aromatică la pH alcalin sau prin încălzirea cu HCl a unui suport ce conţine o grupare azidă se obţin izocianaţii respectivi. Aceştia se pot utiliza la imobilizarea enzimelor prin formarea unor legături de tip peptidic.

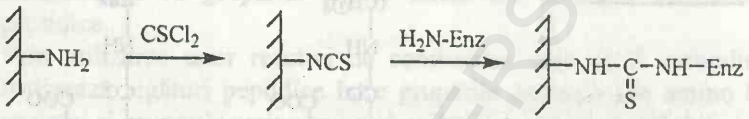


BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ca suporturi de bază insolubile se pot folosi polizaharide: CM-celuloză, Sephadex sau poliaminopolistiren. Astfel, pe derivatul cu funcțiune izocianat a poliamino-polistirenului s-a imobilizat catalaza (Chibata, 1978).

Imobilizarea prin formarea unei legături tioamidice

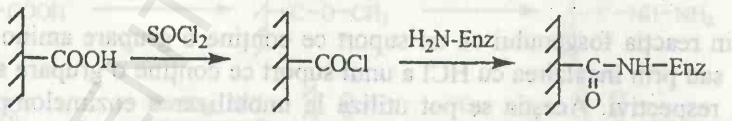
Principiul acestei metode este foarte asemănător cu cel al activării cu grupări izocianat, doar că gruparea grefată este de izotiocianat, iar legătura ce se formează între grupele active ale enzimei și suportul activat este de tip tioamidic. Se pornește de la un suport care conține grupări aminice libere, care se activează prin reacție cu tiofosgen ($CSCl_2$).



Ca suporturi pentru acest tip de imobilizare s-au folosit sticlă poroasă aminosilanizată, hidroxiapatită și silice. Pe derivatul izotiocianic al sticlei poroase aminosilanizate s-au imobilizat enzime ca glucozoxidaza, tripsina, sau papaina.

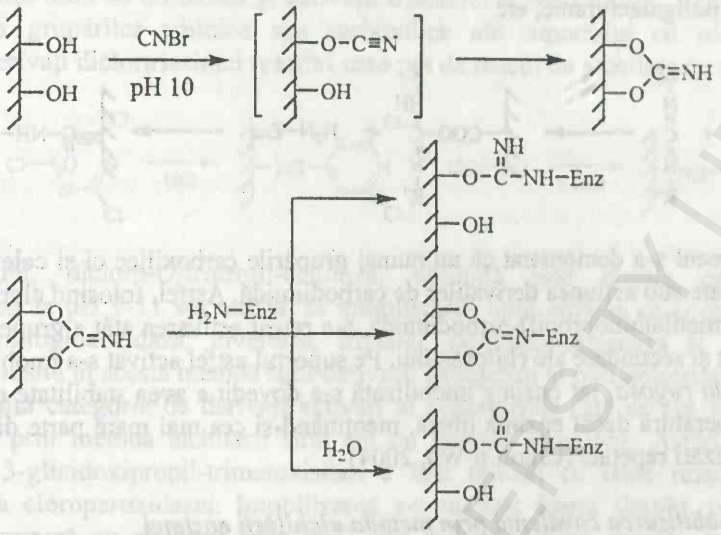
Imobilizarea pe derivați de cloruri de acizi

Asemenea derivați pot fi obținuți prin reacția suportului ce conține grupări carboxilice cu o soluție de clorură de tionil. Suportul activat în acest mod poate reacționa cu enzima, la temperaturi joase. A fost prima metodă folosită pentru imobilizarea prin legare covalentă a unei enzime, de Bradenberger, în 1956 (Chibata, 1978).



Imobilizarea pe polizaharide activate cu bromcian

A fost utilizată pentu prima oară în 1967 (Axen ș.a., 1967). Constă în activarea unui suport ce conține legături OH vicinale, de exemplu polizaharidă, sticlă sau ceramică, prin reacție cu bromcian, obținându-se o stare intermediară de cianat și apoi un imidocarbonat reactiv. Acesta reacționează cu molecula de enzimă, formând derivați de izouree N-substituită, de imidocarbonați N-substituiți, sau de carbamați N-substituiți.



Tehnica de imobilizare este simplă, legarea enzimei de suportul insolubil făcându-se în condiții blânde. În consecință, metoda este larg aplicată pentru imobilizarea unui mare număr de enzime. De exemplu pe Sepharose activată cu bromcian s-au imobilizat lactat dehidrogenaza, glucozoxidaza, peroxidaza, aminoglucozidaza, tripsina, α-chimotripsina, subtilizina, proteaza neutră, etc.

Deşi procedeul de imobilizare este simplu, metoda are totuşi şi anumite dezavantaje:

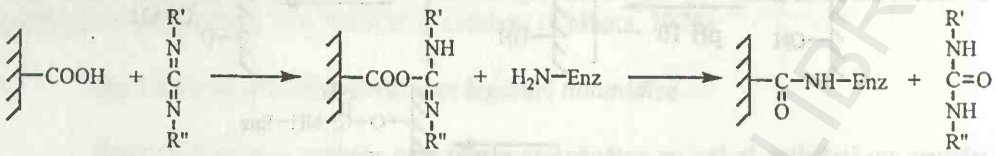
- toxicitatea mare a bromcianului
- pH-ul ridicat necesar pentru derivatizare şi cuplare
- prezența în plus a unor grupări cu sarcini electrice care pot determina adsorbții nespecifice nedorite.

Această metodă a fost larg folosită pentru imobilizarea enzimelor şi există o serie de suporturi comerciale disponibile, cum ar fi Sepharose activată cu bromcian.

Imobilizarea prin reacții de condensare a enzimei cu suportul

Grupările carboxil sau amino ale suporturilor şi grupările amino sau carboxil ale enzimei se pot condensa direct prin formarea unor legături peptidice dacă se foloseşte un reactiv de condensare cum este carbodiimida sau reactivul Woodward K (N-etil-5-fenilizoxazoliu-3'-sulfonat). Un exemplu de suport care se poate utiliza pentru acest tip de imobilizare este carboximetil celuloza. Acesta reacționează cu derivatul de carbodiimidă cu formare de derivați de *O*-acilizouree, iar suportul activat în acest mod se cuplează cu o grupă amino a enzimei (Weliky, Brown şi Dale, 1969).

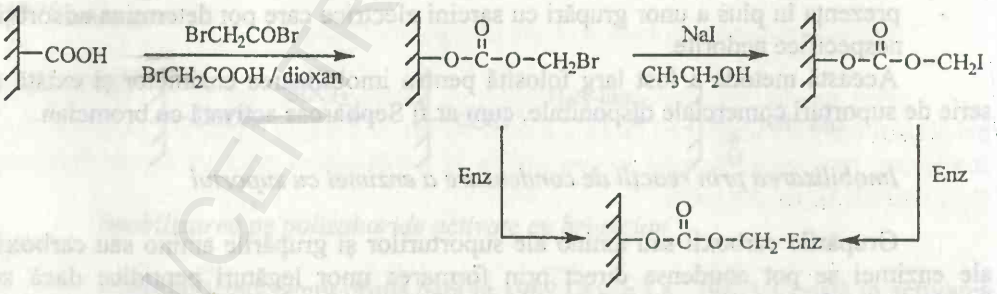
Alte suporturi cu grupe carboxil utilizate au fost CM-Sephadex, polimetacrilat de metil, acid poligalacturanic, etc.



Recent s-a demonstrat că nu numai grupările carboxilice ci şi cele hidroxilice pot fi activate sub acţiunea derivaţilor de carbodiimidă. Astfel, folosind clorhidrat de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidă, s-a reuşit activarea atât a grupelor hidroxil primare cât şi secundare ale chitosanului. Pe suportul astfel activat s-a imobilizat lipaza din *Candida rugosa*, iar enzima imobilizată s-a dovedit a avea stabilitate mai mare la pH şi temperatură decât enzima liberă, menţinând-şi cea mai mare parte din activitate după reutilizări repetate (Chiou şi Wu, 2004)

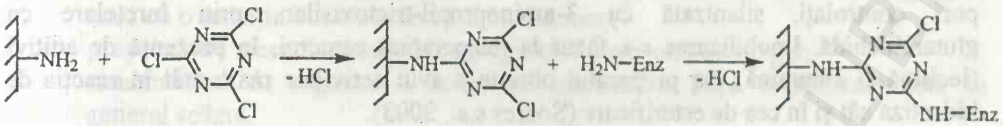
Imobilizarea covalentă prin metoda alchilării enzimei

Grupările reactive ale suportului care pot da reacţii de alchilare reacţionează uşor cu grupările amino, hidroxil fenolic, sau sulfhidril ale moleculei de enzimă cu formare de legături covalente. Exemple de asemenea suporturi activate sunt acetilceluloza halogenată (bromacetil celuloza, iodacetil celuloza) sau derivaţii triazinil ai celulozei sau răşinilor schimbătoare de ioni (Kay şi Crook, 1967). Bromacetil celuloza se obţine prin reacţia celulozei cu bromură de bromacetil, în mediu de dioxan-acid bromhidric, iar iodacetil celuloza se obţine din bromacetil celuloză prin reacţie cu iodură de sodiu în mediu de etanol.



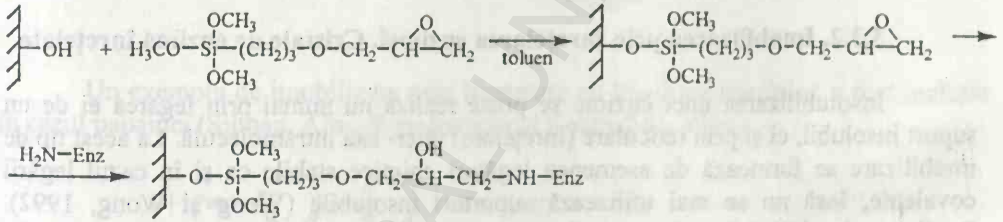
Exemple de enzime imobilizate pe bromacetil celuloză au fost tripsina, chimotripsina şi ribonucleaza.

Foarte mult se utilizează şi derivaţii triazinici ai suporturilor. Aceştia se obţin prin reacţia grupărilor aminice sau carboxilice ale suportului cu triclortriazină, rezultând derivaţi diclortriazinici reactivi care pot da reacţii de alchilare cu enzimele.



Astfel, dicloro-*O*-triazinil-celuloza, obţinută prin reacţia celulozei cu triclortriazină la pH 9-11 s-a utilizat la imobilizarea unor enzime ca şi chimitripsina, catalaza, amiloglucozidaza, invertaza, tripsina, lactatdehidrogenaza şi altele. Alte suporturi folosite în acestă metodă sunt derivaţii halogenaţi ai polimetacrilaţilor.

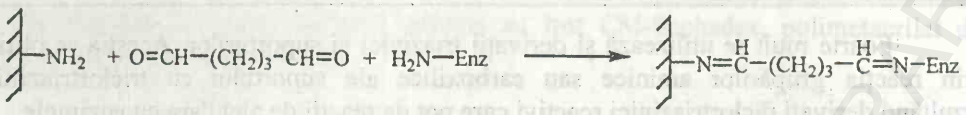
O altă categorie de derivaţi activaţi ai suporturilor care se pot folosi pentru imobilizare prin metoda alchilării sunt cei cu grupări epoxidice. Astfel, silicagelul activat cu 3-glicidoxipropil-trimetoxisilan a fost utilizat cu bune rezultate pentru imobilizarea cloroperoxidazei. Imobilizarea s-a realizat foarte simplu, prin agitarea enzimei împreună cu suportul timp de 2 ore la temperatura camerei, într-o soluţie tampon de pH adecvat (Petri, Gambicorti şi Salvadori, 2004).



Înrețelarea enzimei cu suportul

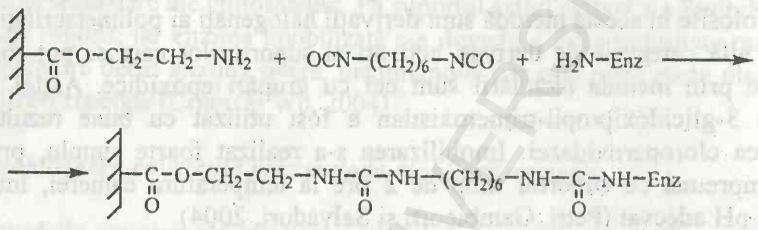
Pe lângă metodele care se bazează pe activarea suportului, există şi variante în care suportul nu necesită activare, legarea făcându-se cu ajutorul unor compuşi bi- sau polifuncţionali reactivi. În aceste cazuri are loc formarea unor legături covalente cu participarea grupărilor amino ale suportului şi grupărilor amino ale enzimei.

Reactivul bifuncţional cel mai des utilizat este glutaraldehida, care duce la formarea unor derivaţi de tipul bazelor Schiff. Drept suporturi pentru acestă metodă de imobilizare se pot utiliza aminoetil celuloza (AE-Cellulose), DEAE-Cellulose, aminoetil-poliacrilamida, derivaţii aminosilanici de sticlă poroasă şi alte suporturi ce posedă grupări aminice. Un exemplu de asemenea imobilizare este înrețelarea aminoetil celulozei cu grupările amino ale enzimei cu formarea unor legături similare celor din bazele Schiff, prin intermediul glutaraldehidei (Falb, Lynn şi Shapira, 1973).



. Lipaza din *Candida rugosa* a fost imobilizată prin legare covalentă pe sticlă cu pori controlați, silanizată cu 3-aminopropil-trietoxisilan, prin înrețelare cu glutaraldehidă. Imobilizarea s-a făcut la temperatura camerei, în prezență de aditivi (lecitină și albumină), iar preparatul obținut a avut activitate mare atât în reacția de hidroliză cât și în cea de esterificare (Soares ș.a., 2003).

Altă categorie de reactivi de înrețelare mult utilizată o reprezintă diizocianații, de exemplu hexametilen-diizocianatul, care s-a utilizat pentru imobilizarea aminoacilazei pe suport de aminoetil celuloză (Chibata, 1978).



3.3.2. Imobilizarea prin înrețelarea enzimei. Cristale de enzimă înrețelate.

Insolubilizarea unei enzime se poate realiza nu numai prin legarea ei de un suport insolubil, ci și prin reticulare (înrețelare) inter- sau intramoleculă. La acest tip de imobilizare se formează de asemenea legături chimice stabile ca și în cazul legării covalente, însă nu se mai utilizează suporturi insolubile (Wong și Wong, 1992). Realizarea imobilizării se face prin formarea unor agregate enzimatice tridimensionale, complet insolubile în apă, cu ajutorul unor reactivi de înrețelare bi- sau multifuncționali cum ar fi glutaraldehida (legare prin formarea de bază Schiff), diizocianați ca toluilendiizocianat sau hexametilendiizocianat (legare peptidică), *bis*-diazobenzidină (cuplare diazo), *N,N'*-polimetilen-*bis*-iodacetamida (alchilare) sau *N,N'*-etilen-*bis*-maleinimida (legare peptidică). Enzimele înrețelate sunt așadar macromolecule insolubile.

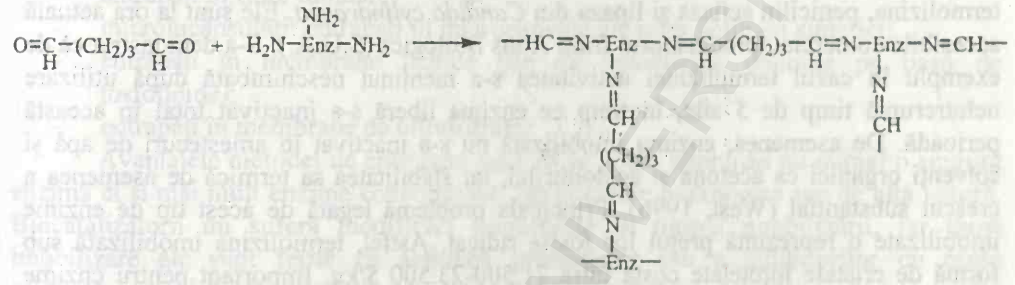
Grupele funcționale ale proteinei ezimatice care participă la formarea acestor legături sunt grupele amino terminale, grupa ε -amino a lizinei, grupa fenolică a tirozinei, grupa sulfhidril a cisteinei și grupa imidazol a histidinei. Condițiile de reacție pentru formarea legăturilor covalente între aceste grupări și grupările active ale agenților de înrețelare sunt destul de severe, ca și în cazul legăturii covalente. Așadar, conformația centrului activ al enzimei poate fi ușor afectată, determinând pierderi semnificative de activitate (Chibata, 1978).

Cel mai important avantaj a imobilizării prin înrețelare este că procesul se realizează practic într-o singură treaptă, utilizând un agent bi- sau multifuncțional.

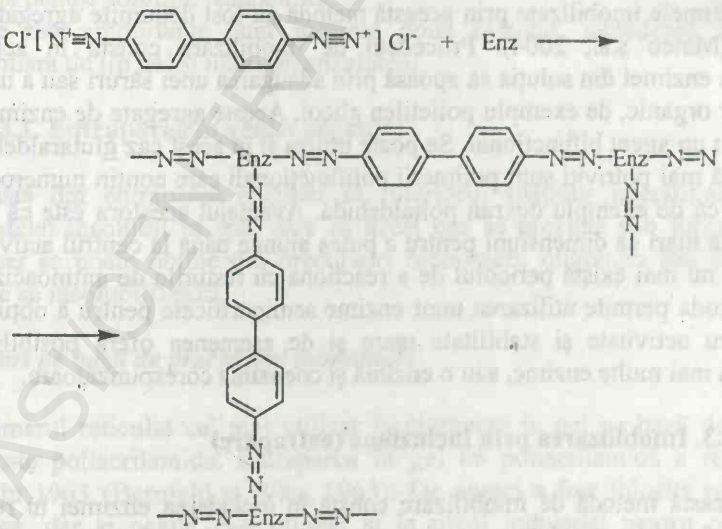
Metoda are însă și dezavantaje:

- dificultatea controlării gradului de înrețelare pentru obținerea unor agregate mari cu o retenție bună a activității enzimatice;
- proprietățile mecanice slabe ale agregatelor, care sunt de tip gel;
- randamentul de regăsire a activității enzimatice după imobilizare este în general scăzut.

Glutaraldehida este rectivul de înrețelare cel mi mult folosit. Un exemplu de enzimă care poate fi imobilizată prin această metodă este chimotripsina (Broun, 1976). Celulele microbiene pot fi de asemenea înrețelate cu glutaraldehidă.



Un exemplu de imobilizare prin înrețelare cu bis-diazobenzidină a fost realizat în cazul papainei (Silman, Albu-Weissenberg și Katchalski, 1966).



BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Din cauza dezactivării importante care se înregistra în urma imobilizării, această metodă a fost puțin folosită, deși ea era cunoscută încă din 1964 când s-a imobilizat carboxipeptidaza A prin înrețelare cu glutaraldehidă.

În ultimii ani a apărut ideea folosirii în biocataliză a cristalelor de enzimă înrețelate (St. Clair și Navia, 1992). Spre deosebire de înrețelarea clasică a enzimelor care folosește preparate enzimatice brute, această metodă realizează înrețelarea enzimelor cu un grad foarte ridicat de puritate. Se realizează înrețelarea enzimei cu glutaraldehidă într-o particulă insolubilă de enzimă. Avantajul acestei metode este că spre deosebire de restul enzimelor imobilizate care constau din 90-95% suport și doar restul enzimă, de data aceasta se obține un preparat de enzimă aproape pur, însă cu stabilitate mult mai mare decât enzima liberă.

Exemple de enzime care au fost imobilizate prin această metodă sunt termolizina, penicilin acilaza și lipaza din *Candida cylindracea*. Ele sunt la ora actuală accesibile comercial, producătorul fiind Altus Biologics (S.U.A.). S-a demonstrat că de exemplu în cazul termolizinei activitatea s-a menținut neschimbată după utilizare neîntreruptă timp de 5 zile, în timp ce enzima liberă s-a inactivat total în această perioadă. De asemenea, enzima imobilizată nu s-a inactivat în amestecuri de apă și solvenți organici ca acetona și acetonitrilul, iar stabilitatea sa termică de asemenea a crescut substanțial (West, 1996). Principala problemă legată de acest tip de enzime imobilizate o reprezintă prețul lor foarte ridicat. Astfel, termolizina imobilizată sub formă de cristale înrețelate costă între 21.500-23.500 $/kg. Important pentru enzime industriale este însă nu costul în sine al catalizatorului ci costul pentru un kg de produs și aici diferențele nu mai sunt așa de mari.

Pentru a reduce costurile enzimei imobilizate, recent a fost reactualizată ideea înrețelării unor enzime cu grad de puritate nu atât de avansat cum sunt cristalele de enzimă. Enzimele imobilizate prin această metodă au fost denumite agregate enzimate înrețelate (Mateo ș.a., 2004). Procedeul de imobilizare constă în acest caz în precipitarea enzimei din soluția sa apoasă prin adăugarea unei săruri sau a unui solvent sau polimer organic, de exemplu polietilen glicol. Aceste agregate de enzimă sunt apoi înrețelate cu un agent bifuncțional. Se poate utiliza și în acest caz glutaraldehida, dar se consideră că mai potriviți sunt polimerii polifuncționali care conțin numeroase grupări aldehidice, ca de exemplu dexran polialdehida. Avantajul acestora este că moleculele lor sunt prea mari ca dimensiuni pentru a putea ajunge până la centrul activ al enzimei și de aceea nu mai există pericolul de a reacționa cu resturile de aminoacizi din acest centru. Metoda permite utilizarea unor enzime semipurificate pentru a obține agregate înrețelate cu activitate și stabilitate mare și de asemenea oferă posibilitatea de a coimobiliza mai multe enzime, sau o enzimă și coenzima corespunzătoare.

3.3.3. Imobilizarea prin incluziune (entrapare)

Această metodă de imobilizare constă în includerea enzimei în rețeaua unui polimer sau închiderea ei într-o membrană semipermeabilă, suficient de strâns pentru a

preveni desprinderea ei, însă permiţând difuzia substratului şi a produşilor. Spre deosebire de metodele de legare covalentă şi de înreţelare, în acest caz enzima însăşi nu este legată de gel sau de membrană. Aşadar, imobilizarea prin entrapare poate avea aplicaţii largi la un mare număr de enzime, celule şi mărimi. În aceste condiţii, în general dezactivarea enzimei este redusă comparativ cu metodele clasice de cuplare. Totuşi, dacă pentru entrapare se utilizează o reacţie chimică de polimerizare, condiţiile de reacţie pot fi destul de severe şi în unele cazuri se înregistrează pierderea activităţii enzimatice.

Biocatalizatorii imobilizaţi prin entrapare pot fi:

- entrapaţi în matricea unui gel înreţelat cu structură de polizaharidă, proteină sau polimer sintetic;
- entrapaţi în fibre tubulare;
- microincapsulaţi: entrapaţi în microcapsule ale unor polimeri sintetici;
- entrapaţi în membrane lichide (de ex. membrane obţinute pe bază de fosfolipide);
- entrapaţi în membrane de ultrafiltrare.

Avantajele metodei de entrapare sunt că se poate imobiliza nu numai o singură enzimă ci şi mai mult enzime concomitent, cât şi celule microbiene sau de altă natură. Biocatalizatorii nu suferă modificări importante în timpul imobilizării, iar după imobilizare ele sunt ferite de acţiunea proteazelor sau a inhibitorilor cu mase moleculare mari. Dezavantajele metodei sunt că substraturile cu mase moleculare mari nu pot pătrunde la centrul activ al enzimei şi suporturile nu sunt regenerabile.

Entraparea în membrane de ultrafiltrare poate evita dezavantajele altor metode de entrapare, însă de multe ori enzima precipită pe suprafaţa membranei, care devine impermeabilă pentru soluţiile reactanţilor.

Cele mai importante sunt primele două metode: includerea într-o reţea macromoleculară de tip gel şi microincapsularea.

3.3.3.1. Entraparea în geluri organice

Constă din entraparea enzimei în interiorul spaţiilor interstiţiale ale unui polimer înreţelat insolubil în apă, care în acest caz se prezintă sub forma unui gel. Acest polimer se poate obţine din precursori monomeri, oligomeri sau din polimeri naturali, care se insolubilizează.

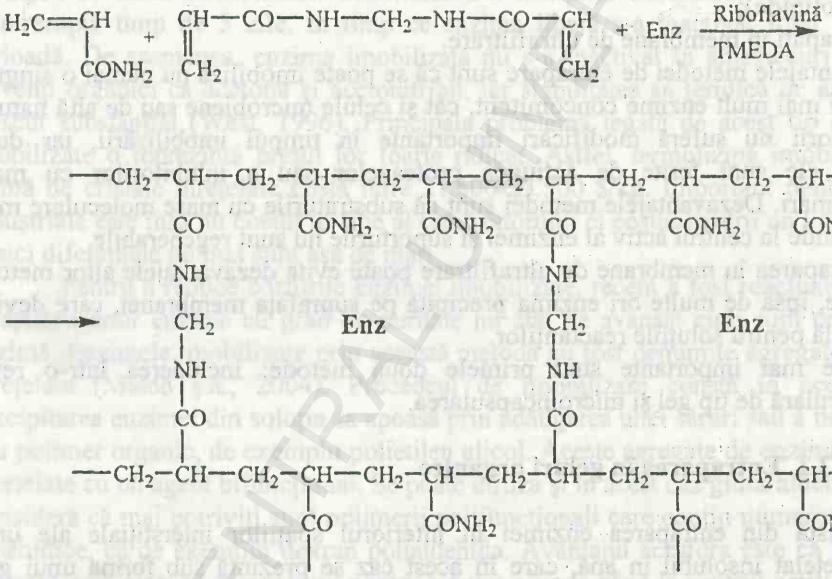
Geluri pe bază de precursori monomeri

Polimerul reticulat cel mai utilizat la entrapare în gel pe bază de precursori monomeri este poliacrilamida. Entraparea în gel de poliacrilamidă a fost realizată prima oară în 1963 (Bernfeld şi Wan, 1963). De atunci a fost folosită pentru foarte multe enzime, dar şi celule. S-a utilizat şi la nivel industrial pentru obţinerea L-aspartatului, L-malatului şi acrilamidei cu ajutorul unor celule microbiene entrapate în

gel de poliacrilamidă. Există enzime care sunt inactivate sub acțiunea acrilamidei, de aceea s-au elaborat o serie de variante ale acestei metode care utilizează derivați de acrilamidă.

Obținerea gelului de poliacrilamidă se face prin polimerizarea radicalică a acrilamidei în soluție apoasă, în prezența unui agent de reticulare, care este de obicei *N,N'*-metilen-*bis*-acrilamida. Pentru a se realiza entraparea reacția de polimerizare are loc în prezența enzimei dizolvate în soluție, la temperatură relativ scăzută (între 10-25°C), pentru a preveni degradarea enzimei (Preda, Peter și Dragomirescu, 2003). Inițierea polimerizării se face cu persulfat de potasiu ($K_2S_2O_8$) sau cu riboflavină și reacția poate fi accelerată de prezența β-dimetilamino propionitrilului (DMAPN) sau a *N,N,N',N'*-tetrametil etilen diaminei (TMEDA): $(CH_3)_2N\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}N(CH_3)_2$.

Blocul de gel rezultat poate fi tăiat mecanic în particule de diferite dimensiuni. Dezavantajul acestor geluri este slaba rezistență mecanică și distribuția relativ largă a dimensiunilor porilor.



Inițierea reacției de polimerizare a acrilamidei se poate face și cu ajutorul radiațiilor X. Acestă variantă prezintă avantajul că se poate realiza la -5°C, după înghețarea soluției de monomer și enzimă, evitându-se inactivarea termică în cazul enzimelor termosensibile. Totuși, enzimele imobilizate astfel nu au avut o activitate substanțial mai mare decât cele obținute în catalizatori chimici, ceea ce a făcut, ținând cont de costurile ridicate și echipamentele necesare, ca metoda iradierii cu raze X să nu fie utilizată industrial.

Poliacrilamida se poate obține și sub forma unor particule sferice, dacă soluția apoasă ce conține enzima și acilamida este dispensată într-un mediu hidrofob, cum ar fi toluenul sau cloroformul.

În afară de poliacrilamidă, la entrapare s-au utilizat și alți monomeri, inițierea polimerizării făcându-se prin iradierea cu radiații γ (Maeda, Yamauchi și Suzuki, 1973). Monomerii folosiți au fost fie hidrofili, ca 2-hidroxietil-metacrilat, 2-hidroxietilacrilat sau *N*-vinil-2-pirolidonă, fie hidrofobi ca dietilenglicol dimetacrilat, hexandiol monometacrilat sau metilmetacrilat. Cu aceste tipuri de monomeri se pot obține o gamă largă de polimeri cu hidrofobicități diferite, porozități controlate și care pot asigura o retenție bună a activității enzimatice. La iradierea cu radiații γ a soluției conținând monomerul și enzima au loc atât reacția de polimerizare cât și cea de înrețelare, nemaifiind nevoie de prezența unui agent de înrețelare.

Entraparea în geluri pe bază de 2-hidroxietil-metacrilat, folosind ca agent de înrețelare dietilenglicol dimetacrilatul, se poate face și pe cale clasică la temperatura camerei, folosind ca inițiator di (*sec*-butil)-peroxi-dicarbonatul. Prin această metodă se poate imobiliza tripsina (O'Driscoll, 1976).

Geluri pe bază de prepolimeri sintetici

Pe măsură ce entraparea biocatalizatorilor necesita geluri având anumite proprietăți fizico-chimice, găsirea unor polimeri naturali care să satisfacă toate cerințele a devenit tot mai problematică. Pe de altă parte, realizarea reacției de polimerizare în prezența enzimei duce de multe ori la inactivarea acesteia fie din cauza condițiilor de reacție, fie datorită efectului inhibitor al monomerului materie primă. Din acest motiv au fost dezvoltate metodele de entrapare bazate pe prepolimeri sintetici (Fukui, Sonomoto și Tanaka, 1987).

Avantajele utilizării prepolimerilor sintetici sunt:

- procedeele de entrapare sunt simple și au loc în condiții blânde;
- căldura de reacție este mai scăzută;
- prepolimerii nu conțin monomeri care pot afecta negativ enzima;
- structura reticulară a gelului format poate fi ușor controlată prin folosirea unor prepolimeri de mărime stabilită;
- proprietățile fizico-chimice ale gelului, cum ar fi hidrofobicitatea sau caracterul ionic pot fi modificate sintetizând un prepolimer adecvat, înainte de a se realiza entraparea enzimei.

Dezavantajul acestei variante de imobilizare este că grupările funcționale reactive ale oligomerului: epoxi, carbonil sau izocianat, pot să reacționeze și cu enzima, obținându-se o enzimă imobilizată atât prin entrapare în gel cât și prin legare covalentă.

Oligomerii care s-au utilizat pentru reacții de entrapare a enzimelor au fost de mai multe tipuri:

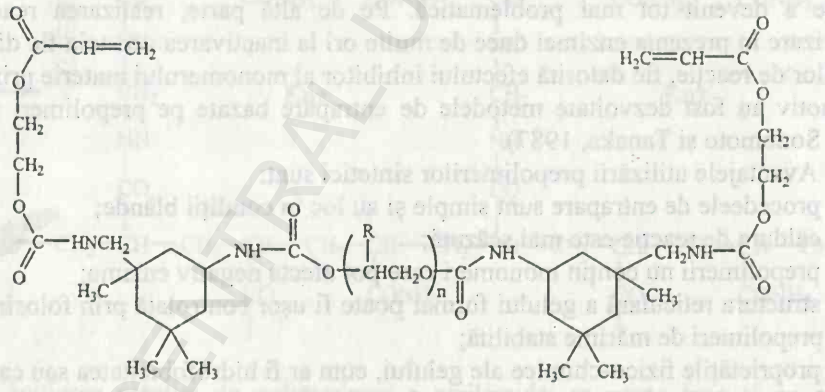
- Oligomeri fotoreticulabili derivați ai poliglicolilor (polietilenglicol, polipropilenglicol) și polibutadienei. În aceste cazuri polimerizarea se face prin adăugarea unui inițiator fotochimic și expunere la lumină ultravioletă.

- Prepolimeri uretanici care sunt oligomeri polifuncționali având grupări izocianat. Acestea pot reacționa cu compuși cu grupări hidroxilice, formând o rețea poliuretanică.

- Oligomeri epoxidici bifuncționali care pot da rășini epoxidice prin policondensare cu compuși aminici polifuncționali. Această reacție are loc la temperatura camerei, la un pH slab alcalin (<9). Din păcate în acest caz nu poate fi evitată o anumită inactivare a enzimei, întrucât componenta aminică bazică este un agent de denaturare puternic. Pentru a evita acest fenomen se demarează reacția de policondensare și enzima se adaugă doar înaintea gelifierii.

Dintre acești prepolimeri se remarcă cei fotoreticulabili, care pot avea caracter hidrofob sau hidrofil, natură cationică sau anionică și lungimi de catenă diferite. Gelifierea acestora se realizează prin iradierea soluției ce conține prepolimerul și biocatalizatorul, timp de câteva minute, cu o radiație UV de o anumită lungime de undă, în prezența unui sensibilizator ca benzoin-etil-eterul. Metoda a fost aplicată și la nivel pilot pentru obținerea etanolului, folosind celule entrapate vii de drojdie.

Au fost elaborați prepolimeri de rășini fotoreticulabili având proprietăți hidrofile (R = H) sau hidrofobe (R = CH_3), natură cationică sau anionică și diferite lungimi ale catenei (Gerharz, 1999).

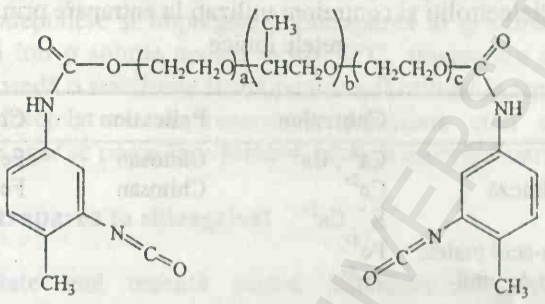


Amestecurile de prepolimeri și biocatalizatori sunt gelifiate prin iradiere cu lumină UV cu lungime de undă mare, timp de câteva minute, în prezența unui sensibilizator adecvat cum ar fi eterul etilic al benzoinei. Această metodă a fost aplicată în producția la scară pilot a etanolului cu ajutorul culturilor de celule de drojdie imobilizate.

O asemenea metodă a fost aplicată în cazul lipazei din *Pseudomonas* sp., care a fost în prealabil transformată într-un complex lipid-enzimă prin amestecarea soluției de

enzimă cu o suspensie de dioleil-glucozilglutamat, urmată de sonicare. Avantajul acestui complex este solubilitatea în solvenţi organici, ceea ce a permis imobilizarea folosind un prepolimer de răşină fotoreticulabilă cu schelet de polipropilenglicol, reacţia având loc în mediu de benzen şi în prezenţă de benzoin-etil-eter. Iradierea s-a făcut cu lumină ultravioletă timp de 10 minute, iar enzima entrapată s-a dovedit a fi un catalizator excelent în reacţii de esterificare şi transesterificare (Fukunaga ş.a, 1996).

O altă categorie de prepolimeri sunt cei uretanici, a căror utilizare pentru entrapare este mult mai simplă, ea necesitând doar amestecarea lor cu soluţia apoasă de biocatalizator. Se formează legături ureice şi se pune în libertate bioxid de carbon.



Aceşti prepolimeri pot imobiliza nu doar enzime, ci atât organele celulare cât şi celule microbiene. S-a demonstrat că balanţa hidrofil-hidrofobă a acestor geluri afectează în special bioconversia compuşilor lipofilici în sisteme de solvenţi organici (Fukui, Sonomoto şi Tanaka, 1987).

Geluri pe bază de precursori polimeri

În afară de polimerii sintetici obţinuţi din monomeri sau prepolimeri, pentru entrapare se utilizează şi polimeri care pot forma geluri, mai ales polimeri naturali cum ar fi colagenul, gelatina, agarul, alginatul de sodiu, chitosanul. Pentru realizarea imobilizării prin entrapare trebuie realizată reticularea acestor geluri, care să devină insolubile în apă. Există două asemenea metode: formarea unei reţele ionice şi precipitarea.

Entraparea prin formarea unei reţele ionice

Constă în realizarea unei reţele ionice din polielectroliţi cu ajutorul unor ioni polivalenţi. Metoda are avantajul că este foarte elastică, foloseşte compuşi care nu sunt toxici şi se poate utiliza în cazul unor compuşi foarte sensibili cum ar fi celulele de plante şi protoplastele. Realizarea imobilizării se face prin amestecarea enzimei cu o soluţie apoasă a polielectrolitului corespunzător şi adăugarea acestui amestec, în picături, la o soluţie ce conţine aşa-numitul "contraion". Se formează o structură

poroasă, sferică, uniformă, care poate reține celule întregi sau molecule de enzime cu dimensiuni mai mari decât ale porilor. Câteva exemple de asemenea polielectroliți și contraioni sunt prezentate în Tabelul 3.7.

Polianionul cel mai mult utilizat pentru acest tip de imobilizare este alginatul de sodiu. Entraparea în gel de alginat se face prin amestecarea unei soluții de alginat de sodiu cu soluția apoasă în care se găsește biocatalizatorul, urmată de introducerea acesteia, în picături, într-o soluție de clorură de calciu. Se formează un gel de alginat de calciu insolubil care înglobează enzima sau celula supusă imobilizării (Kierstan și Bucke, 1977).

Tabelul 3.7. Polielectroliți și contraioni utilizați la entrapare prin formarea unei rețele ionice

Polianion	Contraion	Polication	Contraion
Alginat de sodiu	Ca^{2+}, Ba^{2+}	Chitosan	$Fe(CN)_6^{3-}$
Carboximetil-celuloză	Ca^{2+}	Chitosan	$Fe(CN)_6^{4-}$
κ-Caragenan	K^+, Ca^{2+}		
Copolimer stiren-acid maleic	Fe^{2+}		
Copolimer acetat de vinil-acid maleic	Zn^{2+}		

Pentru entraparea lipazei din *Candida rugosa* s-a folosit soluție de alginat 2% în tampon TRIS-HCl 0,1M de pH 7,5, în care s-a dizolvat enzima, iar soluția rezultată s-a picurat într-o soluție de $CaCl_2$ 0,18M, în același tampon (Doumeche ș.a., 2002). În loc de calciu, se pot folosi aluminiu sau alte metale bivalente. Metoda este foarte mult utilizată datorită simplității sale și accesibilității alginatului de calciu.

O metodă originală de entrapare a lipazei recomandă utilizarea alginatului în combinație cu gelatina. În acest caz, grupările amino ale gelatinei interacționează cu grupările carboxil ale alginatului, formând un complex în care este entrapată enzima, iar stabilizarea agregatului se face prin înrețelare cu glutaraldehidă. S-a utilizat soluție 3% de gelatină care s-a amestecat cu soluție de 5% de alginat și cu soluția de enzimă, după care s-a adăugat glutaraldehida, iar amestecul obținut s-a picurat într-o soluție de $CaCl_2$. S-a obținut enzima imobilizată sub formă de perle, care s-a dovedit a fi mai activă decât cea imobilizată în alginat conform metodei clasice, menținându-și activitatea aproape neschimbată după mai multe reutilizări (Fadnavis ș.a., 2003).

Entraparea în gel de κ-caragenan a fost considerată la un moment dat (Chibata și Tosa, 1981) cea mai bună metodă pentru aplicațiile industriale care folosesc celule imobilizate. κ-Caragenanul în soluție salină este amestecat cu soluția sau suspensia de biocatalizator, apoi este introdus în picături în soluția agentului de gelifiere, care poate fi clorură de potasiu. Există și o serie de alți cationi care pot avea rol de gelifiere, de exemplu calciu, aluminiu, sau amoniu. Pentru a crește stabilitatea fizică și chimică a gelurilor obținute, ele pot fi înrețelate cu glutaraldehidă sau hexametilendiamină.

Gelurile pe bază de κ-caragenan le-au înlocuit pe cel pe bază de poliacrilamidă la fabricarea industrială a L-aspartatului (Sato ş.a., 1979) şi L-malatului în Japonia.

Entraparea prin precipitare

Imobilizarea prin acestă metodă se face prin precipitarea unor polimeri naturali modificând unul sau mai mulţi parametri care influenţează solubilitatea ca: temperatura, tăria ionică, pH-ul, polaritatea solventului. Exemple de utilizare a acestei tehnici sunt imobilizarea enzimelor în colagen, agar sau gelatină reticulată. Imobilizarea prin precipitare în gel de colagen s-a realizat prin trei metode: complexare, electrodepunere şi impregnare. Entraparea în gelatină se poate face prin dizolvarea gelatinei într-o soluţie apoasă la 40-50°C, amestecare cu enzimă şi răcire. Acest gel însă nu posedă o stabilitate fizică pentru a fi utilizat la temperaturi normale şi de aceea trebuie înreţelat cu un reactiv de înreţelare cum este glutaraldehida. Entraparea în gel de agar se poate face printr-o tehnică asemănătoare.

3.3.3.2. Entraparea în silicageluri

O posibilitate mai recentă pentru imobilizarea biomoleculelor implică entraparea acestora în matrici de silicaţi anorganici, formate la o temperatură scăzută printr-o tehnică de producere a sol-gelului. Procesul de producere a sol-gelului, ca o cale de-a forma sticle organice a fost cunoscut deja în perioada anilor 1850 (Hench şi West, 1990). Cu toate acestea, prima referinţă privind folosirea materialelor pe bază de silicaţi pentru entraparea unei componente biologice nu a apărut decât la mijlocul anilor 1950 când Dickey a demonstrat că mai multe enzime pot fi entrapate în derivaţi de acid polisilicic de tip sticle, cu reţinerea parţială a activităţii lor biologice (Dickey, 1955). Din păcate importanţa acestei descoperiri nu a fost realizată la acel moment şi dezvoltarea biomaterialelor derivate de sol-gel nu a fost abordată timp de trei decenii. Abia în 1990 a revenit în actualitate entraparea proteinelor în sticle de tip silicaţi, derivaţi ai alcoxisilanilor, demonstându-se că o serie de enzime, incluzând aspartaza şi fosfatoza alcalină, pot fi entrapate în sticle provenite din tetraetil ortosilicat (TEOS), cu reţinerea activităţii enzimatice (Braun ş.a., 1990) . Din acest moment au apărut multe lucrări descriind entraparea unei mari varietăţi de specii biologice incluzând enzime, anticorpi, proteine regulatoare, proteine legate de membrană, acizi nucleici şi chiar celulele întregi într-un număr mare de materiale compozite derivate de sol-gel (Gill şi Ballesteros, 2000).

Cele mai importante avantaje ale materialelor silicatice derivate de sol-gel pentru imobilizarea proteinelor sunt (Jin şi Brennan, 2002):

1. Pot fi făcute transparente din punct de vedere optic, fiind ideale pentru dezvoltarea senzorilor chimici şi biochimici care se bazează pe modificarea unui semnal de adsorbţie sau fluorescenţă.

2. Permit o mare varietate de modificări chimice, bazate pe includerea mai multor aditivi de polimeri, modificatori redox şi silani modificaţi organic, rezultând materiale ce conduc electricitatea, potrivite pentru senzori electrochimici.
3. Au o mărime şi distribuţie potrivită, care permite moleculelor mici şi ionilor să difuzeze în matrice, în timp ce biomoleculele mari ramân închise în pori făcând posibilă bioanaliza dependentă de mărimea moleculei.

Totuşi asemenea materiale pot fi fragile sau pot să crape din cauza hidratării excesive şi în unele cazuri pot bloca accesibilitatea compuşilor analizaţi către biomoleculele entrapate. Mai mult, interacţiunile proteină-silicat şi analit-silicat pot duce la denaturarea proteinei, fiind nevoie de materiale nanocompozite organice-anorganice pentru a depăşi astfel de probleme.

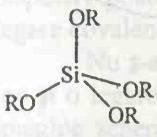
Pentru a se putea realiza imobilizarea biomoleculelor prin procesul sol-gel este nevoie de îndeplinirea următoareleor cerinţe generale:

- Metoda trebuie să fie aplicabilă soluţiilor apoase, deoarece în general acestea sunt necesare pentru a menţine funcţia biologică a biomoleculelor.
- Reacţia de polimerizare trebuie să fie compatibilă cu domeniile de pH şi cele de tărie ionică necesare pentru funcţionarea proteinei (pH 4-10, domeniul de tărie ionică 0,01-1,00 M).
- Procesul trebuie aibă loc la temperatura apropiată temperaturii camerei pentru a menţine proteinele în conformaţia lor nativă.
- Materialele trebuie să aibă o mărime a porilor suficient de mică pentru a preveni antrenarea biomoleculelor în soluţie, dar destul de mare pentru a permite compuşilor cu molecule mai mici să patrundă în matrice cu uşurinţă.
- Proprietăţile materialului ar trebui să permită modificarea mediului intern pentru a favoriza activitatea biomoleculelor entrapate.
- Atunci când este folosit drept componentă a unui biosenzor, materialul final trebuie să fie transparent din punct de vedere optic sau conducător de electricitate, pentru a permite măsurători spectroscopice sau electrochimice.
- Fabricarea materialului trebuie să fie simplă, directă şi reproductibilă permiţând obţinerea unei varietăţi de forme ce includ sticlă groasă, filme subţiri, fibre, pudră şi altele.

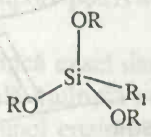
Tehnica entrapării enzimelor în sol-gel

Procesele sol-gel au fost studiate foarte bine în ştiinţa materialelor. Ele pot fi împărţite în două clase în funcţie de natura precursorilor: precursori anorganici şi precursori alcoxidici. Calea alcoxidică este importantă pentru materialele utilizate la

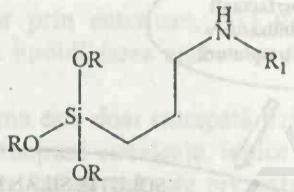
imobilizări şi implică transformarea acestor precursori într-un polimer anorganic extrem de reticulat prin hidroliză şi reacţii de condensare. Exemple de precursori alcoxidici sunt: tetraalcoxisilani, alchiltrialcoxisilani, trialcoxisilani funcţionali, alcoximetalaţi.



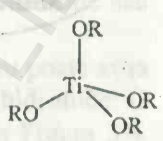
Tetraalcoxisilani



Alchiltrialcoxisilani



Trialcoxisilani funcţionali



Alcoximetalaţi

Biocompuşii derivaţi de sol-gel sunt preparaţi în mod general conform procesului prezentat în Figura 3.3 (Jin şi Brennan, 2002).

Formarea unui biocompozit sol-gel începe cu hidroliza parţială sau completă a unui precursor potrivit într-un solvent organic, de exemplu alcooli, pentru a forma un sol apos (dispersie coloidală a particulelor într-un lichid). Precursorii pot fi alcătuiţi din tetraalcoxisilani, mono-, di-, tri-alchilalcoxisilani sau pot conţine grupări funcţionale de tip alchil, aril, amino carboxil, tiol sau alte grupări. Alte centre metalice cum ar fi: Al, Ti, V sau Ce pot fi de asemenea folosite pentru a modifica proprietăţile materialului. Reacţia de hidroliză implică un atac nucleofil al apei la atomul de siliciu central. Mecanismul este dependent de catalizatorul folosit. Sunt posibile trei tipuri de cataliză: acidă, bazică (ioni OH^-) şi nucleofilă (F^-, *N*-metilimidazol, etc.). Hidroliza poate fi urmată de transesterificare cu aditivi cu compuşi conţinând grupe hidroxilice, cum ar fi glicerina pentru a forma poli(gliceril silicaţi) care sunt mult mai biocompatibili decât alcoxisilanii tipici (Gill, 2001).

După hidroliză, solul poate fi folosit imediat sau poate fi păstrat timp de câteva săptămâni pentru a permite evoluţia continuă a particulelor de sol. În tot acest timp se produc reacţii de condensare şi continuă hidroliza, rezultând un mare număr de polisilicaţi liniari, ramificaţi şi coloidali. Precursorul hidrolizat este apoi amestecat cu o soluţie tampon apoasă ce conţine biomoleculele, alături de cataliżatori, aditivi pentru controlul uscării, polimeri, agenţi de modelare sau materiale de umplutură, care sunt necesari pentru modificarea proprietăţilor materialului finit. În mod uzual reacţia de polimerizare este iniţiată printr-o schimbare a pH-ului şi poate dura o perioadă de timp între minute la ore, dând un gel (o structură solidă continuă ce înglobează o fază lichidă continuă). Gelifierea precursorului de sol este însoţită de entraparea biomoleculei.

Gelurile iniţiale sunt moi, uşoare şi conţin o cantitate mare de apă (50-80%) şi pori mari (până la 200 nm diametru). Maturarea reţelei de silicat umed timp de câteva zile până la câteva săptămâni determină continuarea reacţiilor de condensare şi face reţeaua mai puternică. În timpul acestei etape, alcoolul entrapat şi apa rezultată din hidroliza iniţială şi din reacţia de condensare vor fi îndepărtate din matrice, făcând ca

aceasta să se micşoreze cu 10-30%, diametrul porilor să scadă cu aproximativ 25% şi proporţia relativă a grupărilor siloxan faţă de grupările de silanol să crească.

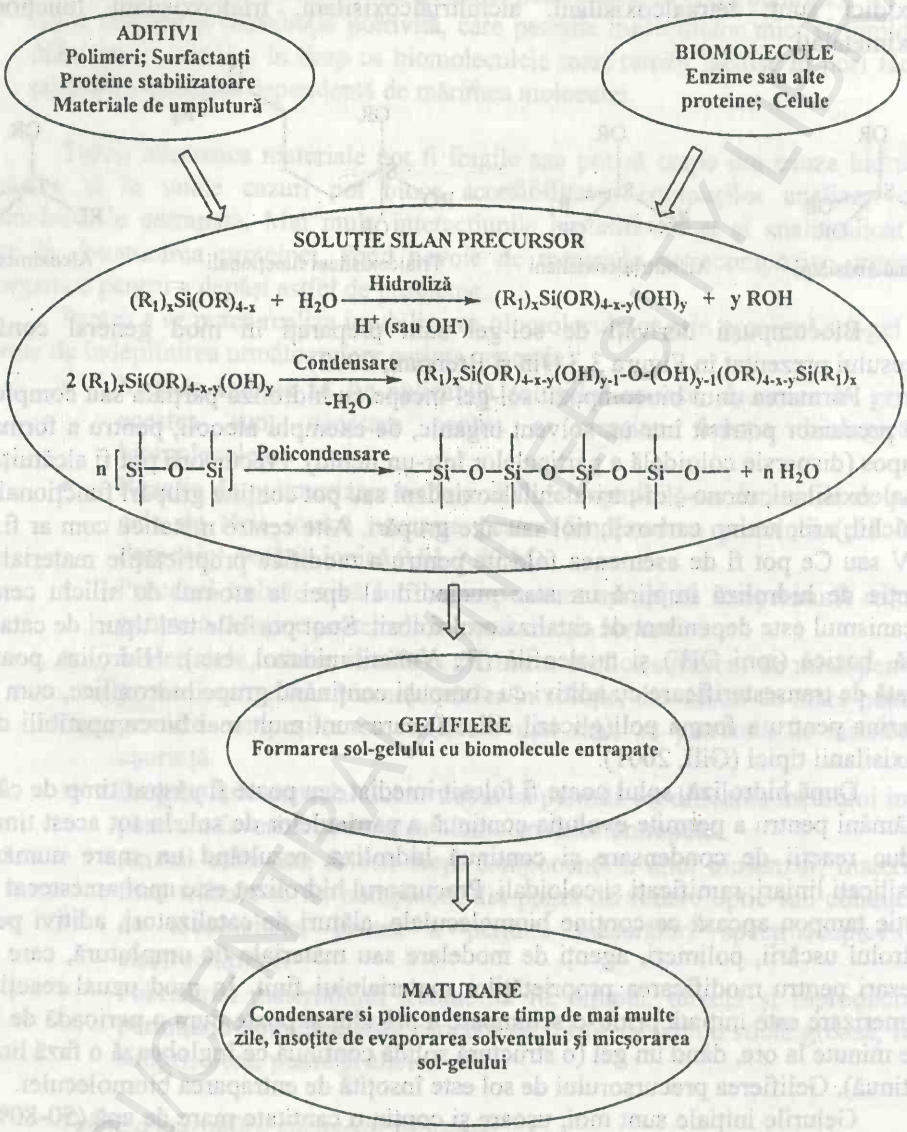


Figura 3.3. Schema entrapării biomoleculelor în sol-gel

În final, materialul maturat este uscat, rezultând evaporarea celei mai mari părţi din apa interstiţială, continuarea reacţiilor de înreţelare din matrice, micşorarea a

porilor până la 2-20 nm şi o contractare globală a materialului până la 85% din volumul său iniţial. Gelul uscat se numeşte xerogel. Xerogelurile sunt materiale interesante datorită porozităţii lor şi ariei ridicate a suprafeţei lor. Ele pot fi transformate în ceramică prin sinterizare, ceea ce nu este cazul când matricea de siliciu se foloseşte pentru imobilizarea enzimelor prin entrapare, însă materialul ceramic respectiv poate fi un suport potrivit pentru imobilizarea enzimelor prin adsorbţie sau legare covalentă.

Nu s-a stabilit încă exact dacă enzima este doar entrapată fizic, sau poate avea loc şi o legare adiţională multiplă prin interacţiuni covalente, ionice sau hidrofobe. O imagine schematică a unei enzime entrapate în sol-gel este prezentată în Figura 3.4. (Pierre, 2004).

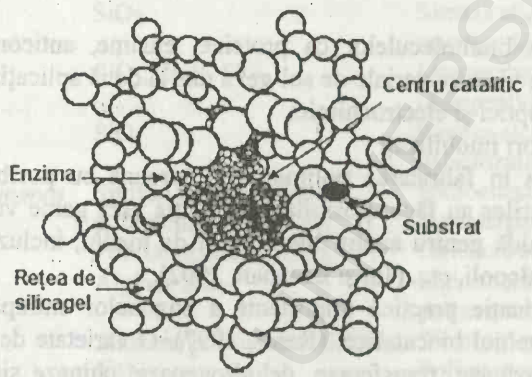


Figura 3.4. Imaginea schematică a unei enzime entrapate în sol-gel

Tipuri de biocompuşi derivaţi de sol-gel

În funcţie de precursorii şi aditivii folosiţi pot fi preparate sticle anorganice, sticle modificate organic sau materiale nanocompozite organice sau anorganice. Materialele anorganice sunt în general derivate din tetraetoxisilan sau tetrametoxisilan şi ca atare ele pot elibera o mare cantitate de alcool în timpul hidrolizei, care trebuie îndepărtată cel puţin parţial pentru a reduce denaturarea proteinei în timpul entrapării.

Silicaţii modificaţi organic, care se obţin prin adăugarea de silani cu grupări funcţionale organice la tetraetoxisilan sau tetrametoxisilan duc la o mare varietate de proprietăţi ale materialului obţinut. Pot fi folosite pentru a conferi materialului proprietăţi hidrofile, hidrofobe, ionice, posibilitatea formării de legături de hidrogen sau alte caracteristici. Asemenea caracteristici pot fi folosite pentru a spori stabilitatea unor anumite proteine, în special proteine hidrofobe şi lipofile. De exemplu, lipaza a fost de 88 ori mai activă în sticle modificate organic decât în materiale pure derivate din tetraetoxisilan (Reetz, Zonta şi Simpelkamp, 1996). Un potenţial dezavantaj al sticlelor organo-silicatice este că prezenţa grupărilor alchil reduce gradul de înrețelare,

ducând la materiale mai puțin robuste. În plus funcțiunea organică poate fi adăugată numai până la un anumit nivel înainte să aibă loc separarea fazelor, determinând transparență optică mai slabă și crăparea materialului. Aplicabilitatea acestor materiale pentru biosenzori este deci limitată.

S-a demonstrat că adăugarea unor aditivi, în special polimeri cum ar fi polietilenglicol, alcool polivinilic, polivinilimidazol sau polietilenimină poate reduce adsorbția de proteine pe silice, probabil datorită legării preferențiale a silicei cu polimerul și deci oferă o activitate globală mai mare pentru moleculele entrapate Asemenea aditivi pot reduce contractarea materialului prevenind colapsarea lor.

Factorii care influențează activitatea, stabilitatea și selectivitatea enzimelor încapsulate în sol-geluri sunt: raportul stoechiometric apă-silan, încărcarea cu enzimă, natura aditivilor și compușilor de umplutură utilizați, timpul de maturare, modalitatea de uscare.

Incapsularea biomoleculelor ca proteine, enzime, anticorpi, antigeni, acizi polinucleici și celule vii în materiale de sol-gel a dus la două aplicații majore:

- Biosenzori optici și electrochimici
- Biocatalizatori imobilizați

Flexibilitatea în fabricarea polimerilor împreună cu posibilitățile variate de producție a sol-gelurilor au făcut posibilă construcția unei game variate de senzori în fază gazoasă și lichidă pentru analiți medicali și de mediu, incluzând glucoză, uree, acetilcolină, lactat, alcooli, etc. (Jin și Brennan, 2002).

A doua aplicație practică importantă a enzimelor entrapate în sol-gel este folosirea lor în domeniul biocatalizei (Reetz, 1997). O varietate de esteraze, proteaze, oxidoreductaze, tirozinaze, transferaze, dehidrogenaze, chinaze și oxigenaze au fost entrapate și folosite pentru a cataliza hidroliza, transesterificarea, condensarea, oxidarea, reducerea, hidroxilarea și reacțiile de polimerizare. Câteva exemple sunt date în Tabelul 3.8. (Gill și Ballesteros, 2000).

Enzimele imobilizate sunt adesea folosite pentru a realiza reacții enantio-, regio- și chemo-selective care pot fi greu realizate prin alte metode. Atât enzimele izolate cât și culturile bacteriene și celulele au fost entrapate în material de sol-gel pentru a cataliza sinteze organice și biotransformări.

Un exemplu important de utilizare a enzimelor imobilizate pentru biocataliză selectivă este imobilizarea lipazelor în materiale hidrofobe de sol-gel, derivate din precursori alchilsilanici de tipul $RSi(OCH_3)_3$. Lipazele entrapate sunt catalizatori excelenți într-o varietate de biotransformări organice sintetice cum ar fi: reacții enantioselective de hidroliză, esterificare și aminoliză.

Tabelul 3.8. Exemple de biocatalizatori incapsulați în sol-gel

Enzima sau celula entrapată	Tipul matricei sol-gel	Aplicație
Lipază (*Candida rugosa*)	Poli(alchilsiloxan)	Hidroliză enantioselectivă de ester
Lipază (*Candida antarctica*)	Poli(alchilsiloxan)-SiO_2	Esterificări enantioselective în solvenți organici
Lipază (*Mucor miehei*)	Poli(alchilsiloxan)-poli(3-aminopropilsiloxan)-SiO_2	Acilări enantioselective ale aminelor
Lipază (*Pseudomonas cepacia*)	Poli(alchilsiloxan)-Fe_3O_4	
Tripsină	SiO_2	Hidroliza amidelor de aminoacizi
α-Chimotripsină	SiO_2	Sinteza oligopeptidelor și esterilor de peptide
Subtilizină	SiO_2; ZrO_2- SiO_2	Sinteza dipeptidelor și oligopeptidelor
α-Galactozidază	SiO_2	Sinteza alchil- și hidroxialchil α-galactozidelor
Oxinitrilază (*Pseudomonas amygdalus*)	Siloxan polifuncțional-poli(metilsiloxan)-SiO_2	Hidrocianarea enantioselectivă ale aldehidelor
Lipoxigenază, tipul I	Poli(metilsiloxan)-SiO_2 Alginat-SiO_2	Oxidarea enantio- și regioselectivă a acizilor grași polinesaturați
Tirozinază	Siloxane polifuncțional-SiO_2	Sinteza derivaților L-DOPA
Peroxidază din hrean	SiO_2	Polimerizarea S-oxidativă a fenolilor
Peroxidază	SiO_2	S-Oxidarea dibenzotiofenei
Alcool dehidrogenază (ficat de cal)	Poli(metilsiloxan)-SiO_2	Oxidarea enantioselectivă ale alcoolilor
Saccharomyces cerevisiae (celule întregi)	SiO_2	Producerea fermentativă a etanolului
	Poli(metilsiloxan)-poli(dimetilsiloxan)-SiO_2	Reducerea enantioselectivă a 3-oxobutanoatului
Acinetobacter johnsonii (celule întregi)	SiO_2	Îndepărtarea reductivă a nitraților

Imobilizarea cu succes a lipazei în sol-gel necesită utilizarea de matrici de silice hidrofobe, preparate din precursori silanici organici alchil-substituiți $RSi(OCH_3)_3$. Exemple de astfel de precursori alchilsilanici sunt metiltrimetoxisilan, etiltrimetoxisilan, propiltrimetoxisilan, *n*-butiltrimetoxisilan, dimetildimetoxisilan, trimetilmetoxisilan, polidimetilsiloxan. De regulă acești alchilsilani sunt utilizați în combinație cu tetrametoxisilan. Utilizând materiale sol-gel hidrofobe derivate din tetrametoxisilan/ *n*-propiltrimetoxisilan (1:5) pentru entraparea lipazelor din diferite surse s-a dovedit că în toate cazurile activitățile lipazelor imobilizate în sol-gel au fost

mai ridicate decât cele ale enzimelor libere disponibile comercial. (Reetz, Zonta şi Simpelkamp, 1996). Explicaţia pentru această creştere de activitate poate fi legată de stuctura centrului activ a lipazei. Interacţiunile domeniilor lipofile ale enzimei cu moleculele de substrat pot induce modificări conformaţionale, în special deplasarea unui aşa numit "capac" α-elicoidal format din nişte grupări hidrofobe ale moleculei de enzimă, care acoperă centrul activ al enzimei. Deplasarea acestuia are ca efect uşurarea accesului moleculelor de substrat spre centrul activ, rezultând forma activă a lipazei. Un efect similar poate fi indus de prezenţa în gel a unor grupe alchil hidrofobe. Interacţiunile lipofile dintre părţile hidrofobe ale gelului şi lipază în timpul procesului de sol-gel pot fixa enzima entrapată într-o conformaţie mai activă şi pot mări activitatea.

O perspectivă deosebită reprezintă şi aplicarea materialelor de tip sol-gel pentru biocataliza multienzimatică. Entraparea a două sau mai multor enzime permite reacţiilor secvenţiale să apară într-un spaţiu restrâns ducând la conversii înalte datorită proximităţii reactivilor şi intermediarilor faţă de suprafeţele active ale enzimelor. Acest lucru a fost folosit deja pentru aplicaţiile biosenzorilor (de exemplu: glucozoxidaza/peroxidaza coentrapate pentru determinarea glucozei), dar de curând a fost demonstrată şi pentru aplicaţiile de biosinteză.

3.3.3.3. Entraparea în fibre

Această metodă, mai puţin utilizată decât entraparea în gel, constă în includerea enzimei în microcavităţile unor fibre sintetice şi a fost elaborată de Dinelli în 1972. Entraparea se realizează prin dizolvarea unui polimer ce formează fibre, de exemplu triacetatul de celuloză (Dinelli, Marconi şi Morisi, 1976), într-un solvent organic nemiscibil cu apa (clorură de metilen, cloroform) şi emulsionarea acestei soluţii cu soluţia apoasă a enzimei. Emulsia este extrudată printr-un orificiu într-un lichid ce are rol de coagulant (toluen sau eter de petrol) care determină precipitarea polimerului în formă de fibră, iar micropicăturile de soluţie de enzimă rămân entrapate în fibră. Fibrele astfel obţinute sunt rezistente la soluţii acide sau bazice slabe, tării ionice ridicate şi unii solvenţi organici. Totuşi utilizarea lor este limitată la compuşi (substraturi) cu mase moleculare mici, datorită împiedicărilor sterice. Enzime entrapate în fibră sunt utilizate în industria farmaceutică (penicilin acilază) şi în industria alimentară (β-D-galactozidază).

3.3.3.4. Imobilizarea prin microincapsulare

Aceasta metodă se bazează pe entraparea unei enzime în interiorul unei microcapsule având la exterior o membrană polimerică semipermeabilă, prin care pot trece moleculele de substrat şi produs. Aceste microcapsule au în general dimensiuni între 1-100 microni (Chang, 1976).

Printre avantajele microincapsulării se numără suprafața mare de contact într-un volum relativ mic între substrat şi enzimă şi posibilitatea de a imobiliza mai multe enzime într-o singură etapă, indiferent dacă este vorba de enzime solubile sau care au fost imobilizate anterior printr-o altă metodă.

Dezavantajele principale ale metodei constau din neaplicabilitatea ei în cazul substraturilor cu greutate moleculară mare, inactivarea ocazională a enzimelor în cursul imobilizării şi posibilitatea încorporării enzimei în peretele membranei în timpul procesului.

Tehnicile experimentale pentru realizarea microincapsulării se pot clasifica în trei categorii (Chibata, 1978):

- separarea de faze
- polimerizarea la interfață
- dubla emulsionare

O a patra tehnică experimentală, cea de incapsulare în membrane lichide, este clasificată de unii tot în categoria acestor metode, în timp ce alții o consideră o metodă distinctă, datorită faptului că ea nu mai implică formarea unei membrane polimere în jurul enzimei.

Metoda separării fazelor

Este o metodă fizică ce se bazează pe coacervare, un fenomen utilizat la purificarea polimerilor şi care implică dizolvarea polimerului într-un solvent organic, urmată de reprecipitarea sa prin adăugarea unui alt solvent care este miscibil cu solventul inițial dar nu dizolvă polimerul.

Schematic, această metodă de imobilizare se poate reda în modul prezentat în Figura 3.5.

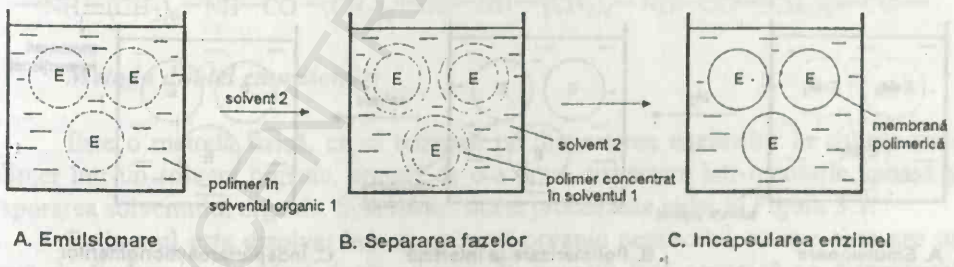


Figura 3.5. Microincapsularea prin metoda separării fazelor

Soluția apoasă de enzimă este dispersată în solventul organic ce conține polimerul. La faza organică ce conține micropicăturile apoase se adaugă celălalt solvent organic, încet, sub agitare. Polimerul se concentrează şi la urmă are loc formarea membranei în jurul enzimei. Cel mai important la acest tip de imobilizare este

ca polimerul să nu fie precipitat, ci separat ca o fază ce conține soluția concentrată de polimer. Dacă polimerul precipită nu are loc incapsularea enzimei.

Exemple de componente pentru imobilizarea prin microincapsulare cu separare de faze sunt prezentate în Tabelul 3.9.

Tabelul 3.9. Componente pentru imobilizarea prin microincapsulare cu separare de faze

Polimer	Primul solvent organic	Al doilea solvent organic
Etilceluloză	Cloroform	Eter etilic
Nitroceluloză	Eter etilic	Benzoat de butil
Polistiren	Xilen	Eter etilic
Acetat de polivinil	Cloroform	Eter etilic

Această tehnică necesită condiții blânde, însă are dezavantajul că îndepărtarea completă a solventului organic ce rămâne în membrana polimeră este anevoioasă.

Metoda polimerizării la interfață

Este o metodă chimică, ce se bazează pe sinteza unui copolimer insolubil în apă la interfața micropicăturilor dintr-o emulsie. Unul din monomeri, cel hidrofil, este solubil parțial atât în faza organică cât și în cea apoasă, iar celălalt, cel hidrofob este solubil doar în faza organică. Polimerizarea acestor monomeri are loc la interfață, obținându-se o membrană semipermeabilă. Tehnica microincapsulării prin polimerizare la interfață este redată schematic în Figura 3.6.

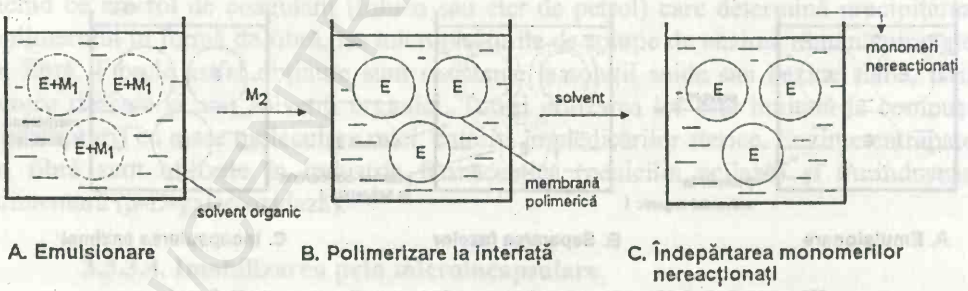


Figura 3.6. Microincapsularea prin metoda polimerizării la interfață

Soluția apoasă a enzimei și a monomerului hidrofil (M_1) sunt emulsionate într-un solvent organic nemiscibil cu apa. La această emulsie se adaugă soluția monomerului hidrofob (M_2) în același solvent, sub agitare. Polimerizarea are loc prin policondensare sau poliadiție, la interfața celor două faze. Astfel faza apoasă ce conține

enzima este inclusă într-o membrană semipermeabilă de polimer. Un element important este coeficientul de repartiție al monomerului hidrofil între cele două faze, el având efect determinant asupra proprietăților membranei polimere. Mărimea microcapsulelor poate fi reglată după necesități, iar timpul necesar pentru reacție este foarte scurt. Totuși există enzime care se pot inactiva în decursul procedeului de microincapsulare. Exemple de componente pentru această metodă de imobilizare sunt prezentate în Tabelul 3.10.

Tabelul 3.10. Componente pentru metoda polimerizării la interfață

Monomer hidrofil	Monomer hidrofob	Tipul polimerului
Poliamină	Clorură de acid dicarboxilic	Poliamidă
Poliol	Diizocianat	Poliuretan
Poliol, Polifenol	Clorură de acid dicarboxilic	Poliester

Una din enzimele care au fost imobilizate prin această metodă este aspartaza, utilizând membrană de tip Nylon (Mori, Tosa și Chibata, 1973). Enzima, împreună cu acid L-aspartic și 1,6-hexametilen-diamină, au fost dizolvate într-o soluție tampon, iar aceasta s-a emulsionat cu un amestec 5:1 ciclohexan-cloroform, utilizând drept emulgator Span 85. La această emulsie s-a adăugat clorura de sebacil, dizolvată în același solvent. Reacția de policondensare are loc la interfață. Microcapsulele se separă prin filtrare sau centrifugare, apoi se spală cu etanol și cu soluție tampon.

$$H_2N{-}(CH_2)_6{-}NH_2 + ClCO{-}(CH_2)_8{-}COCl \longrightarrow$$

$${-}NH{-}(CH_2)_6{-}NH{-}CO{-}(CH_2)_8{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_6{-}NH{-}CO{-}(CH_2)_8{-}CO{-}$$

Metoda dublei emulsionări

Este o metodă fizică, ce se bazează pe dispersarea enzimelor în soluția unui polimer într-un solvent organic, urmată de o a doua dispersare într-o soluție apoasă și evaporarea solventului organic. Schematic, acest proces este redat în Figura 3.7.

Polimerul este dizolvat într-un solvent organic nemiscibil cu apa care are un punct de fierbere mai scăzut decât al apei. În această fază organică se dispersează soluția apoasă de enzimă formând o primă emulsie, de tip apă în ulei. În continuare acestă primă emulsie este dispersată într-o fază apoasă ce conține substanțe coloidale de protecție (gelatină, alcool polivinilic) și substanțe tensioactive, obținându-se o a doua emulsie. Solventul organic este îndepărtat prin încălzire ușoară la vid, sub continuă agitare. Astfel se realizează o membrană polimerică în jurul enzimei, formându-se microcapsula.

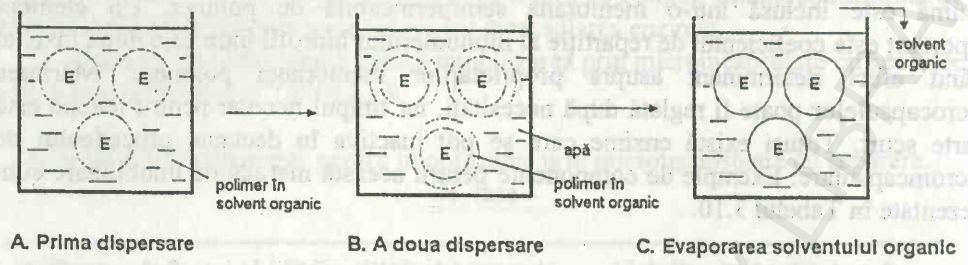


Figura 3.7. Microincapsularea prin metoda dublei emulsionări

Ca şi componente pentru această metodă se folosesc polimeri solubili în solvenţi organici ca etilceluloza, polistirenul, clorcauciucul, etc. Ca solvenţi organici se utilizează benzen, ciclohexan, cloroform.

Spre deosebire de metoda de polimerizare la interfaţă, aici de folosesc polimeri preformaţi şi nu mai are loc o reacţie chimică, ceea ce face ca inactivarea enzimei să fie redusă sau inexistentă. Totuşi metoda are şi dezavantaje:

- Nu se pot obţine microcapsule fine cu diametrul mai mic de 30 microni.
- Uneori cea de-a doua emulsie nu se formează şi randamentul de microcapsule este scăzut.
- Îndepărtarea completă a solventului organic poate dura timp îndelungat.

Exemple de enzime care au fost imobilizate printre această metodă sunt catalaza şi lipaza.

Metoda membranelor lichide

Spre deosebire de celelalte metode de microincapsulare unde există o membrană semipermeabilă polimeră insolubilă în apă, în acest caz incapsularea enzimelor se obţine prin intermediul unei membrane lichide (Gregoriadis, Leathwood şi Ryman, 1971) Acest procedeu implică incapsularea soluţiei enzimatice într-o membrană lichidă conţinând substanţe active de suprafaţă. Soluţia apoasă ce conţine substratul şi produsul şi cea care conţine enzima sunt separate de o fază organică, membrana lichidă, care împiedică amestecarea celor două soluţii apoase miscibile.

Emulsia enzimatică se obţine în două etape. În prima, se realizează emulsionarea soluţiei apoase enzimatice în faza organică (membrana lichidă). Stabilizarea micropicăturilor se obţine prin adăugare de emulgatori, cum ar fi SPAN 80, în faza organică. În cea de-a doua etapă, emulsia stabilă obţinută este introdusă în cealaltă fază apoasă, în care este dispersată prin agitare moderată.

Cea mai importantă caracteristică a microincapsulării cu membrane lichide constă în faptul că permeabilitatea membranei pentru substrat şi/sau produs nu mai depinde de dimensiunile porilor membranei, însă depinde de solubilitatea acestora în componentele membranei.

3.3.4. Evaluarea comparativă a tehnicilor de imobilizare

Cu toate că unele din tehnicile de imobilizare prezentate au putut fi aplicate în cazul unui număr mare de enzime, nu se poate vorbi despre o metodă ideală şi universal valabilă. Cauzele sunt diferenţele mari dintre compoziţiile în aminoacizi şi alte caracteristici chimice ale enzimelor, cât şi cele dintre proprietăţile substraturilor şi produşilor de reacţie. Astfel, fiecare metodă are limitele ei şi pentru fiecare caz în parte trebuie găsită metoda potrivită de imobilizare care să fie simplă, ieftină şi să ducă la un randament de imobilizare şi retenţie a activităţii enzimatice cât mai mari. Este de asemenea important cu stabilitatea operaţională a enzimei imobilizate să fie cât mai ridicată. În aceste condiţii, de multe ori imobilizarea cea mai eficientă se realizează prin combinarea diferitelor metode, de exemplu adsorbţia urmată de înrețelare chimică sau entrapare.

Cu toate acestea se poate face o evaluare comparativă a tehnicilor de imobilizare a enzimelor, bazată pe principalele caracteristici ale procedeului şi ale produsului rezultat. Această comparaţie este sintetizată în Tabelul 3.11.

Tabelul 3.11. Evaluarea comparativă a tehnicilor de imobilizare ale enzimelor

Metodă / Caracteristici	Adsorbţie fizică	Legare ionică	Legare covalentă	Înrețelare	Entrapare
Realizarea imobilizării	uşoară	uşoară	dificilă	dificilă	dificilă
Activitatea enzimei imobilizate	ridicată	ridicată	după caz	moderată	după caz
Specificitatea de substrat după imobilizare	nemodif.	nemodif.	modificată	modificată	modificată
Forţe de legătură între enzimă şi suport	slabe	moderate	puternice	puternice	-
Stabilitatea operaţională a enzimei	redusă	moderată	ridicată	ridicată	moderată
Regenerarea suportului	posibilă	posibilă	rară	imposibilă	imposibilă
Aplicabilitatea metodei	generală	generală	parţială	parţială	generală
Costul imobilizării	scăzut	scăzut	ridicat	mediu	scăzut
Rezistenţa la atac microbian	nu	nu	nu	nu	da

Imobilizarea enzimelor prin metode chimice cum ar fi reticularea intermoleculară şi legarea covalentă implică modificarea lor chimică, ceea ce poate cauza modificări conformaţionale în structura lor şi drept consecinţă scăderea sau pierderea activităţii. Eliminarea acestor dezavantaje se poate face prin realizarea proceselor respective în condiţiile cele mai blânde posibile. În schimb, stabilitatea operaţională a preparatelor imobilizate obţinute este mare datorită legăturilor puternice care se stabilesc. Regenerarea este posibilă doar în cazul legării covalente. Reticularea mai are în plus şi dezavantajul unei stabilităţi mecanice reduse a preparatului. În cazul adsorbţiei fizice şi legării ionice obţinerea enzimei imobilizate se face prin tehnici simple şi ieftine, în condiţii blânde. În acelaşi timp însă se poate produce uşor desprinderea enzimei de pe suport la modificarea tăriei ionice sau a pH-ului, din cauza forţelor de legătură slabe dintre enzimă şi suport. Acest lucru face ca preparatele de acest tip să aibă activitate iniţială mare şi stabilitate operaţională mai redusă. Se poate face însă uşor regenerarea suportului, atât pentru suporturile organice cât şi pentru cele anorganice.

Metodele de entrapare determină teoretic o retenţie mare a activităţii specifice, întrucât nu are loc legarea enzimei de suport. Ele sunt însă limitate la substraturi şi produse cu mase moleculare mici, pentru a depăşi dificultăţile de transfer de masă impuse de polimerul sau membrana utilizată. Au în schimb avantajul aplicabilităţii generale şi protejării enzimei faţă de atacurile microbiene.

3.4. Efectul imobilizării asupra proprietăţilor enzimelor

Modificarea proprietăţilor enzimelor în urma imobilizării este foarte importantă deoarece imobilizarea urmăreşte în general un scop aplicativ, iar o asemenea modificare în sens pozitiv, de exemplu creşterea activităţii specifice sau a stabilităţii la temperatură poate fi un argument în favoarea industrializării procedeului ce foloseşe enzima respectivă.

Modificarea proprietăţilor enzimelor imobilizate faţă de cele libere se poate produce datorită a doi factori: efectul imobilizării asupra enzimei şi efectul suportului asupra parametrilor reacţiei respective (Chibata, 1978).

3.4.1. Influenţa asupra specificităţii de substrat

În urma imobilizării se produce adeseori scăderea activităţii enzimei şi uneori se poate modifica şi specificitatea lor de substrat. Astfel, dacă enzime care acţionează asupra unor substraturi cu mase moleculare mari, cum ar fi proteazele şi amilazele, sunt imobilizate prin metode de legare de suport ca legarea amidică sau diazo pot apare modificări semnificative ale specificităţii de substrat. De exemplu, amiloglucozidaza imobilizată prin legare peptidică pe CM-celulază-azidă păstrează 77% din activitatea enzimei native faţă de amiloza cu masa moleculară de 8000, însă doar 15-17% faţă de amiloza cu masa moleculară de peste 500.000. (O'Neill, Dunnill şi Lilly 1971).

Reducerea drastică a activității față de substraturile cu mase moleculare mari când enzima este imobilizată pe suporturi polimere se datorește împiedicării sterice. În cazul enzimelor imobilizate prin entrapare, existența unui polimer semipermeabil face din start dificilă sau imposibilă acțiunea asupra unor substraturi cu mase moleculare mari.

În anumite cazuri a fost observat însă și fenomenul invers, de creștere a specificității de substrat a enzimei imobilizate față de substraturi cu mase moleculare mari. Astfel, tripsina imobilizată pe Sepharose activată cu bromcian sau sticlă poroasă activată cu izotiocianat a hidrolizat mai ușor cazeina cu masă moleculară mare comparativ cu substraturi sintetice cu masă moleculară mică. Acest lucru se datorește unor forțe de atracție care se manifestă între substrat și suport.

3.4.2. Influența asupra pH-ului optim de acțiune al enzimei

Întrucât enzimele sunt de natură proteică, activitatea lor catalitică este puternic influențată de condițiile de mediu, în special de pH-ul mediului apos. pH-ul optim de acțiune reprezintă o caracteristică a enzimelor care se poate modifica sau nu în urma imobilizării. Modificarea pH-ului optim depinde de încărcarea electrică a moleculei proteice și de încărcarea electrică a suportului.

La o serie de enzime s-a observat în urma imobilizării deplasarea valorii pH-ului optim, fie spre domeniu mai bazic, fie spre domeniu mai acid. În afară de deplasarea valorii optime, în unele cazuri s-a observat și modificarea profilului curbei ce redă dependența activității enzimatice de pH. Este important ca imobilizarea să determine lărgirea domeniului în care enzima are o activitate ridicată, apropiată de cea optimă.

3.4.3. Influența asupra temperaturii optime a enzimei

Activitatea catalitică a enzimelor depinde de temperatură, la fel ca în cazul catalizatorilor chimici obișnuiți, însă peste o anumită limită are loc pierderea acestei activități datorită denaturării termice a proteinei enzimatice. În urma imobilizării la unele enzime apar modificări ale temperaturii optime la care activitatea este maximă. Astfel pentru enzimele entrapate în geluri și în unele cazuri pentru cele legate ionic și covalent s-au înregistrat creșteri de 5-15°C ale temperaturii optime față de enzima liberă. Această modificare se poate datora în cazul legării ionice și covalente schimbărilor în conformația enzimei, iar în cazul entrapării efectelor de difuziune care protejează enzima față de denaturarea la încălzire.

3.4.4. Efectul asupra parametrilor cinetici

Afinitatea enzimei față de substrat se poate modifica după imobilizare, mai ales în urma schimbărilor conformaționale care se produc la nivelul proteinei

enzimatice. Trebuie menționat însă că și celelalte efecte: sterice, de repartiție sau difuzionale, pot să ducă la modificarea valorilor parametrilor cinetici.

Constanta Michaelis, care exprimă afinitatea enzimei față de substrat, poate să crească sau să scadă în urma imobilizării. Scăderea valorii K_m determină o viteză de reacție mai mare pentru aceeași concentrație de substrat, comparativ cu enzima liberă, iar creșterea acestei valori înseamnă că este necesară utilizarea unor concentrații mai mari de substrat pentru a obține aceeași viteză de reacție ca în cazul enzimei libere.

În cazul enzimelor imobilizate putem vorbi de valori aparente ale constantei Michaelis, întrucât vitezele de reacție inițiale pe baza cărora se determină această constantă depind în afară de concentrația substratului și de o serie de alți factori. Constantele Michaelis aparente ale enzimei imobilizate vor descreşte comparativ cu enzima liberă dacă încărcările electrice ale suportului și substratului sunt de semn opus. Această descreștere se datorează forțelor de atracție electrostatică dintre suport și substrat, care determină o creștere a concentrației substratului în vecinătatea enzimei imobilizate. Reacția enzimatică are loc cu concentrații efective de substrat mai mari decât cele din restul soluției și valoarea K_m aparent scade.

În același timp, dacă aceste sarcini electrice sunt în același sens, se va produce o creștere semnificativă a constantei K_m, datorită forțelor electrostatice de respingere. În cazurile când se observă efecte de difuziune interne sau externe care determină creșterea valorii constantelor Michaelis aparente, aceste efecte pot fi contracarate prin mărirea dimensiunilor particulelor enzimei imobilizate sau prin creșterea vitezei liniare a fluidului în apropierea enzimei imobilizate (de exemplu prin mărirea vitezei de agitare sau creșterea debitului de trecere în cazul reactoarelor enzimatice tip coloană). Efectele de difuziune internă sunt foarte pronunțate când enzima este imobilizată prin entrapare.

Imobilizarea enzimelor prin legare covalentă care determină modificări chimice ale moleculei enzimatice duce în general la apariția unor efecte conformaționale și împiedicări sterice ce determină creșterea valorii constantei Michaelis aparente. În ce privește celălalt parametru cinetic important pentru reacțiile enzimatice, viteza maximă de reacție, valorile acestuia au fost în general aceleași sau foarte apropiate de cele obținute în cazul enzimelor libere corespunzătoare.

3.4.5. Efectul asupra stabilității enzimelor

La o serie de enzime s-a constatat creșterea stabilității în urma imobilizării. Acest lucru este extrem de avantajos dacă ne gândim la posibilitatea utilizării industriale a enzimelor imobilizate. Imobilizarea poate determina creșterea stabilității enzimelor față de denaturarea produsă de factori fizici sau chimici, față de enzimele proteolitice, cât și creșterea stabilității operaționale în condițiile de exploatare și menținerea activității un timp mai îndelungat, adică scăderea vitezei de dezactivare. Cu toate că efectul imobilizării asupra stabilității a fost studiat pentru un număr foarte

mare de enzime în condiții foarte variate, nu se poate face o corelare exactă între stabilitate și metoda de imobilizare folosită.

Stabilitatea față de reactivii chimici

Stabilitatea față de diverși reactivi chimici este importantă pentru aplicațiile industriale ale enzimelor imobilizate. Imobilizarea enzimelor a determinat în anumite cazuri creșterea stabilității față de anumiți compuși chimici, cum ar fi agenții de denaturare a proteinei sau unii inhibitori. O semnificație deosebită are faptul că stabilitatea unor enzime față de diverși solvenți organici crește în urma imobilizării, ceea ce poate lărgi considerabil domeniul lor de utilizare. Pe de altă parte s-au constatat și cazuri de scădere a acestei stabilități în urma imobilizării, sau în alte cazuri nu s-au observat modificări ale stabilității enzimei.

Stabilitatea față de enzimele proteolitice

În sistemele de reacție care utilizează preparate enzimatice brute, inactivarea enzimelor se produce sau este accelerată adeseori de enzimele proteolitice care sunt prezente în aceste preparate.

Într-o serie de cazuri în urma imobilizării s-a observat creșterea rezistenței față de atacul enzimelor proteolitice probabil datorită împiedicării sterice care nu permite apropierea enzimei proteolitice cu masă moleculară mare de enzima imobilizată. Din acest motiv entraparea enzimei este considerată cea mai bună metodă pentru stabilizarea împotriva atacului enzimelor proteolitice.

Stabilitatea termică

Se știe că activitatea enzimelor crește cu creșterea temperaturii, în general până la o limită la care se produce inactivarea termică prin denaturarea proteinei. În aceste condiții dacă prin imobilizare se produce creșterea stabilității termice a enzimei, acest lucru mărește posibilitățile de utilizare a enzimei respective. Acest fapt se poate datora efectelor de difuziune internă, care sunt responsabili și pentru creșterea stabilității la pH și la unii agenți de denaturare chimică.

Cu toate că nu s-a putut stabili o legătură clară între metoda de imobilizare și stabilitatea termică, s-a observat că în multe cazuri entraparea și legarea covalentă duc la preparate enzimatice cu stabilitate termică mai bună. Pe de altă parte, multe dintre enzimele imobilizate prin adsorbție fizică au prezentat o scădere a stabilității față de temperatură, așadar această metodă nu este indicată atunci când este necesară o stabilitate termică ridicată a enzimei imobilizate.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Stabilitatea la depozitare

Stabilitatea la depozitare a unei enzime reprezintă capacitatea sa de a-şi menţine într-o proporţie cât mai mare şi un timp cât mai lung activitatea catalitică la temperatura de depozitare, care este în general o temperatură joasă, în jur de 4°C. La marea majoritate a enzimelor, stabilitatea la depozitare a crescut în urma imobilizării. Dintre metodele de imobilizare, legarea covalentă se pare că are efectul cel mai favorabil în această privinţă.

Stabilitatea operaţională

Reprezintă menţinerea activităţii enzimatice în timp, în condiţiile de exploatare şi este unul dintre cei mai importanţi factori care determină utilizarea industrială a enzimelor imobilizate.

Pierderea activităţii enzimelor imobilizate în condiţiile operaţionale se poate datora fie denaturării enzimei, fie pierderii enzimei de pe suport. În cazul suporturilor poroase mai poate avea loc uneori şi un blocaj reversibil al porilor. Scăderea stabilităţii operaţionale se înregistrează mai ales dacă s-au utilizat metode de imobilizare care determină formarea unor legături mai slabe cu suportul: adsorbţia fizică sau legarea ionică, în timp ce în cazul enzimelor imobilizate prin legare covalentă stabilitatea operaţională este în general ridicată. Tipul de reactor utilizat: cu agitare sau tubular cu pat fix (tip coloană) influenţează de asemenea acest parametru, agitarea determinând scăderea activităţii în timp datorită şocurilor mecanice la care este supusă enzima imobilizată. Pierderea activităţii enzimatice în condiţiile de operare se poate datora şi contaminării microbiene.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4. REACŢII ENZIMATICE ÎN SOLVENŢI ORGANICI

4.1. Principii de bază

Cât timp utilizarea biocatalitică a enzimelor a fost limitată numai la mediul lor natural apos ea nu a dat rezultate foarte spectaculoase, din mai multe motive:

- multe substraturi de interes nu sunt solubile în apă;
- prezenţa apei poate duce la reacţii secundare nedorite şi o serie de compuşi organici se pot degrada în prezenţa apei;
- echilibrul termodinamic al multor reacţii este nefavorabil în prezenţa apei;
- recuperarea produsului de reacţie din mediul apos poate fi dificilă.

În principiu, majoritatea acestor dificultăţi pot fi depăşite dacă reacţia enzimatică se face în mediu de solvent organic. Problema principală în acest sens a fost că multă vreme solvenţii organici au fost consideraţi toxici pentru enzime, în sensul că aceştia şi-ar pierde ireversibil activitatea în asemenea medii. Această afirmaţie se baza pe studiul comportării enzimelor în medii apos-organice, în care într-adevăr de multe ori ele se denaturau. În mediu de solvenţi organici anhidri însă situaţia este alta, deoarece în absenţa apei care acţionează ca un lubrifiant molecular enzimele sunt foarte rigide şi în consecinţă îşi păstrează conformaţia catalitic activă (Klibanov, 2001).

La ora actuală, este un fapt demonstrat că un mare număr de enzime rămân active în medii organice şi, în plus, ele pot dobândi o serie de proprietăţi noi şi utile care nu ar fi de aşteptat într-un mediu aparent ostil. Există pe de altă parte o serie de enzime care îşi menţin activitatea în medii apos-organice între anumite limite şi aceste enzime pot fi folosite în asemenea sisteme de reacţie. Adăugarea unei cantităţi moderate de solvent organic determină creşterea solubilităţii substraturilor hidrofobe, prin aceasta făcându-se posibilă reacţia. Se pot utiliza atât solvenţi miscibili cu apa cât şi nemiscibili. În cel de-al doilea caz se obţin sisteme bifazice în care enzima şi celelalte substanţe hidrofile sunt prezente în faza apoasă iar substraturile hidrofobe şi produşii de reacţie se găsesc în faza organică (Figura 4.1).

Figura 4.1. Prezentarea schematică a unei transformări enzimatice într-un sistem bifazic apă-solvent organic.

Pentru ca biotransformarea să aibă loc moleculele de substrat trebuie să treacă din faza apoasă în faza organică, iar după terminarea reacției moleculele hidrofobe de produs se vor transfera înapoi în faza organică.

Distribuția reactanților între cele două faze ale sistemului (apă-solvent organic) poate fi controlată prin alegerea solventului corespunzător și într-o oarecare măsură prin controlul fazei apoase, de exemplu prin modificarea pH-ului (care trebuie să fie potrivit și pentru enzimă). Această repartiție a substraturilor și produșilor în faza organică este un avantaj mai ales atunci când în sistemele omogene pot apare probleme de inhibiție datorate substratului și/sau produsului.

În ce privește enzimele utilizate în medii predominant organice, acestea se pot clasifica în două categorii: prima categorie include preparate enzimatice solide cu enzima sub formă de pulbere sau imobilizată pe suport, iar cea de-a doua categorie se referă la enzime solubilizate în solvenți organici. Solubilizarea se realizează prin modificări covalente ale enzimei sau utilizând surfactanți, fie în scopul solubilizării fie pentru crearea unor microemulsii. Delimitarea dintre preparatele enzimatice în suspensie și cele solubilizate nu este strictă, mai ales când se formează particule foarte mici (Adlercreutz, 1996).

4.1.1. Alegerea solventului

În toate sistemele biocatalitice conținând solvenți organici, natura solventului influențează în mare măsură activitatea și stabilitatea enzimei. Polaritatea solventului joacă rolul cel mai important, în sensul că scăderea constantei dielectrice a mediului conduce la creșterea interacțiunilor electrostatice dintre grupările enzimei și determină scăderea flexibilității interne a enzimei. Întrucât această flexibilitatea este o proprietate necesară în actul catalitic, reducerea ei este însoțită și de reducerea activității catalitice a enzimei. Asadar, polaritatea ridicată a centrului catalitic activ al enzimei a fost considerată drept un factor care contribuie la creșterea activității catalitice (Affleck ș.a., 1992). De asemenea, schimbările în zona centrului activ pot modifica legarea și/sau conversia substraturilor, iar dacă modificarea constantei dielectrice este drastică poate fi afectată și structura tridimensională a proteinei.

Prezența unui solvent organic reprezintă întotdeauna un risc pentru inactivarea enzimei. Multe studii au avut ca temă modul în care substanțele organice interacționează cu moleculele de enzimă și influența lor asupra stabilității enzimatice. La folosirea solvenților miscibili cu apa în concentrații mici nu s-a observat nici un efect negativ asupra enzimei. Adăugarea unor cantități mai mari, necesare uneori pentru dizolvarea substraturilor, a determinat deseori inactivarea enzimei. Gradul de inactivare depinde de tipul solventului folosit și pentru fiecare solvent inactivarea se produce cu atât mai rapid cu cât concentrația apei scade mai mult sub o anumită valoare (Khmelnitsky ș.a., 1988). S-a determinat pentru diferiți solvenți organici concentrația critică de apă, care reprezintă acea concentrație a apei la care enzima mai deține jumătate din activitatea catalitică manifestată în mediu apos. În cazul unei serii de alcooli, dioli și trioli, această concentrație critică a crescut odată cu creșterea valorii

log P și deci a hidrofobicității solventului. Glicerina, cel mai hidrofilic solvent din grup (valoarea log P cea mai mică) a determinat cea mai mică inactivare. Log P reprezintă o măsură a polarității unui solvent și este definit ca logaritmul coeficientului de partiție al unei substanțe într-un sistem bifazic standard 1-octanol/apă. Valorile log P pot fi determinate experimental sau pot fi calculate pe baza structurii moleculare a solventului (Rekker, 1977). Pentru o serie de solvenți organici uzuali, aceste valori sunt prezentate în Tabelul 4.1 (Laane ș.a., 1987).

Tabelul 4.1. Valorile log P pentru solvenți uzuali

Solvent	log P	Solvent	log P
Trietilenglicol-dimetileter	-1,9	Cloroform	2,0
Dietilenglicol-dimetileter	-1,3	2,4-Dimetil-3-pentanol	2,3
N,N-Dimetilformamidă	-1,0	3-Etil-3-pentanol	2,3
Etilenglicol-dimetileter	-0,75	2-Metil-2-hexanol	2,3
4-Hidroxi-4-metil-2-pentanonă	-0,34	Toluen	2,5
Acetonitril	-0,33	Trifluorotricloroetan	2,8
Acetonă	-0,23	Eter butilic	2,9
1-Metil-2-pirolidonă	-0,20	2,6-Dimetil-4-heptanol	3,4
2-Butanonă	0,28	Hexan	3,5
Diclorometan	0,60	Eter pentilic	3,9
2-Metil-2-propanol	0,79	Eter izoamilc	4,0
2-Pentanonă	0,80	1-Octenă	4,2
3-Pentanonă	0,80	Eter fenilic	4,3
Eter etilic	0,85	Izooctan	4,5
1,2-Dicloretan	1,2	1-Nonenă	4,7
2-Metil-2-butanol	1,3	Eter hexilic	5,0
4- Metil-2-pentanonă	1,3	Nonan	5,1
t-Butilmetil eter	1,4	Decan	5,6
2-Metil-2-pentanol	1,8	1-Dodecenă	6,2
3-Metil-3-pentanol	1,8	Dodecan	6,6
Izopropil eter	1,9		

Tendința solvenților de a inactiva enzimele nu depinde numai de hidrofobicitatea lor ci și de alte caracteristici fizico-chimice cum ar fi capacitatea de solvatare și geometria moleculară. Luându-se în considerare anumiți factori au fost calculate "capacitățile de denaturare" ale solvenților. Pentru mulți dintre solvenții miscibili cu apa aceste valori calculate s-au corelat foarte bine cu datele experimentale ale inactivării enzimelor. Calculele au arătat că solvenții nemiscibili cu apa nu sunt suficient de solubili în apă pentru a atinge pragul concentrației care determină inactivarea. Totuși, acest grup de solvenți poate influența enzimele nu numai datorită moleculelor de solvent dizolvate (toxicitate moleculară), ci și prin prezența unei faze

organice separate care constituie un alt risc pentru inactivarea enzimei (toxicitate fazică) (Bar, 1986). Pentru unele enzime toxicitatea moleculară este dominantă iar pentru alte cazuri problema o costituie toxicitatea fazică. Efectul toxicității fazice depinde atât de natura cât și de aria interfeței apă-solvent organic. O interfață cu arie mare determină inactivarea rapidă a enzimei dar favorizează transferul de masă al substraturilor și produșilor între cele două faze.

În cazul solvenților nemiscibili cu apa, s-a constatat că cei puternic hidrofobi, având valori log P>4, determină o inactivare mai slabă decât solvenții mai hidrofili. Pe baza acestor rezultate, considerând întreaga gamă de solvenți, se pare că există un grup cu valori intermediare ale log P (între 0 și 2) care inactivează în măsură mai mare biocatalizatorii decât solvenții cu valori ale log P mai mici sau mai mari. Pentru anumite aplicații, solvenții din acest grup sunt necesari pentru a dizolva substratul și în aceste cazuri sunt necesare compromisuri, luându-se în considerare atât stabilitatea enzimei cât și solubilizarea substratului. Trebuie însă menționat că efectul solventului asupra enzimei în general nu poate fi prezis prin corelare simplă cu parametri cum ar fi log P. De exemplu, lipaza s-a dovedit a fi mult mai stabilă în solvenți hidrofobi, în timp ce chimotripsina a fost mai stabilă în solvenți mai puțin hidrofobi.

Preparatele enzimatice solide pot fi utilizate într-o gamă largă de solvenți, ceea ce oferă multe posibilități pentru optimizarea alegerii solventului ținându-se cont de activitate, stabilitate și alți factori importanți. În sistemele care folosesc enzime solubilizate în mediu organic alegerea solventului este însă de multe ori limitată. Enzimele modificate covalent cu polietilenglicol prezintă o bună solubilitate în special în hidrocarburi aromatice și în hidrocarburi clorurate, în timp ce pentru majoritatea enzimelor în microemulsii solvenții uzuali sunt hidrocarburile.

4.1.2. Tipuri de preparate enzimatice solide

Enzime liofilizate

Cea mai frecventă metodă de utilizare a enzimelor în mediu organic este formarea unei suspensii a enzimei în solvent. Enzimele sub formă de pulbere obținute prin liofilizare au fost folosite într-un mare număr de aplicații. Exemple tipice pentru aceste cazuri sunt rezoluțiile unor amestecuri racemice utilizând enzime hidrolitice (în special lipaze) în care etapa enzimatică a fost combinată cu etape chimice pentru obținerea de compuși chirali în formă optic activă.

Întotdeauna este important ca starea de ionizare a enzimei să fie potrivită pentru cataliză. Întrucât protonarea și deprotonarea enzimei se produc rareori în mediul organic, starea de ionizare a enzimei trebuie să fie corespunzătoare în momentul în care se face liofilizarea. Aceasta se face prin ajustarea pH-ului soluției de enzimă înainte de liofilizare, apoi enzima își păstrează starea de ionizare din soluția apoasă. Acest efect este denumit "memorarea pH-ului" enzimei în mediul de solvent organic (Zaks și Klibanov, 1985). Pentru realizarea unei valori dorite de pH, se folosesc soluții tampon corespunzătoare.

B.C.U. "M. EMINESCU" IAȘI

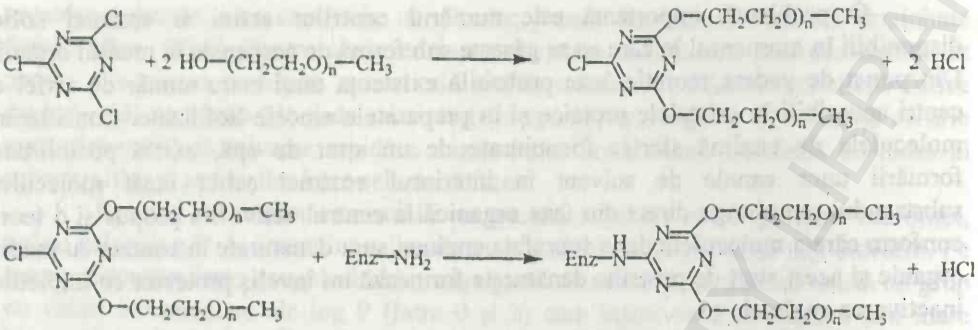
O problemă importantă este numărul centrilor activi ai enzimei solide disponibili în momentul în care ea se găseşte sub formă de suspensie în mediul organic. Din punct de vedere teoretic, este probabilă existența unui mare număr de astfel de centri accesibili în cristalele proteice şi în preparatele amorfe liofilizate. Considerând moleculele de enzimă sferice înconjurate de un strat de apă, există posibilitatea formării unor canale de solvent în interiorul enzimei astfel încât moleculele substratului pot ajunge direct din faza organică la centrul activ. S-a propus şi o teorie conform căreia moleculele de la suprafața enzimei sunt denaturate în contact cu mediul organic şi acest strat de proteine denaturate formează un înveliş protector ce împiedică inactivarea enzimei.

Pulberile de enzimă liofilizată sunt catalizatori potriviți pentru multe aplicații. Totuşi, uneori particulele de enzimă au tendința de a forma agregate care se depun pe pereții reactorului, în special când enzima este hidratată. Aceste probleme pot fi înlăturate prin imobilizarea enzimei pe un suport solid. Este posibil ca enzimele imobilizate să aibă activitate catalitică mai ridicată decât cele neimobilizate. Aceasta se datorează răspândirii enzimei pe o suprafață mare care determină ca o proporție mare de centri activi să fie disponibili pentru funcția catalitică, facilitând şi transferul de masă al substraturilor şi produşilor de reacție. O altă explicație este faptul că suportul protejează enzima de inactivarea reversibilă din timpul uscării sau liofilizării, prin aceasta menținând numărul centrilor activi ridicat. Imobilizarea enzimelor pe suporturi s-a dovedit a fi benefică şi este folosită în special în aplicațiile la nivel industrial. Atât pentru aceste aplicații cât şi pentru cele la nivel de laborator este importantă alegerea unei metode potrivite de imobilizare şi a suportului corespunzător. În ceea ce priveşte suportul sunt importante atât caracteristicile morfologice cât şi cele chimice, iar pentru aplicațiile practice o importanță deosebită au şi proprietățile mecanice.

Preparate enzimatice solubilizate

Enzime modificate covalent

Se poate realiza legarea covalentă a enzimei de polimeri solubili, după tehnicile cunoscute. Un asemenea exemplu este folosirea polietilenglicolului pentru obținerea unor preparate enzimatice solubile în solvenți organici (Inada ş.a., 1990). În mod obişnuit, polietilenglicolul trebuie activat înainte de utilizare şi derivatul activat reacționează apoi cu enzima. Activarea se poate face de exemplu cu clorură de cianuril. Monometoxi-polietilenglicolul reacționează cu clorura de cianuril, astfel încât două resturi de polietilenglicol vor fi legate de aceasta. Grupările amino ale enzimei exercită un atac nucleofil la cea de-a treia poziție activată a clorurii de cianuril. În acest mod două lanțuri de polietilenglicol vor fi legate împreună cu enzima şi agregatul obținut va fi solubil în solvenți organici.



Alte posibiltăţi de modificare ale enzimelor pentru creşterea solubilităţii în solvenţi organici sunt modificarea cu polistiren sau poliacrilaţi.

Complecşi necovalenţi ai enzimei

Asemenea complecşi se pot obţine folosind surfactanţi sau polimeri.

Solubilizarea enzimelor în solvenţi organici se poate realiza prin formare de complecşi, utilizând surfactanţi neionici şi cationici, mai puţin cei anionici care sunt ineficienţi. Rezultate bune s-au obţinut cu didodecilglucozil glutamat. Prin acest procedeu aproximativ 150 de molecule de surfactant s-au ataşat fiecărei molecule de lipază, având ca rezultat complecşi cu mase moleculare de 130 kDa. S-a observat o bună solubilitate a acestui complex în diizopropileter, benzen, toluen şi hexan în timp ce în hidrocarburile clorurate nu s-a observat activitate enzimatică deşi complecşii formaţi erau solubili. Activitatea catalitică a crescut cu creşterea lungimii lanţului alchil (C_8 - C_{16}) din dialchilglucozilglutamaţi (Tsuzuki ş.a., 1991).

Enzimele pot fi solubilizate în solvenţi organici folosindu-se ca agenţi de solubilizare anumiţi polimeri. Astfel, complecşii etilcelulozei cu chimotripsina au fost solubilizaţi în toluen. Metoda cea mai eficientă de preparare a complexului a fost liofilizarea enzimei şi a polimerului din soluţia apoasă şi dizolvarea acestui preparat în solventul organic. Prezenţa unor săruri în soluţia apoasă are importanţă deosebită în formarea complexului. Din punct de vedere practic este important de multe ori ca enzima şi produsul de reacţie să poată fi separaţi în scopul purificării produsului şi reutiiizării enzimei. Când se folosesc complecşi enzimă-polimer, acest lucru se poate realiza uşor prin introducerea apei în sistem care determină separarea fazelor, enzima găsindu-se în faza apoasă iar produşii hidrofobici în faza organică.

Microemulsii cu enzime

O altă metodă pentru solubilizarea enzimelor în sisteme organice cu conţinut scăzut de apă este formarea unor microemulsii. Din punct de vedere macroscopic, aceste amestecuri omogene sunt amestecuri izotropice formate din apă, solvent organic şi surfactant. Întrucât microemulsiile sunt stabile din punct de vedere termodinamic,

ele pot fi realizate prin simpla amestecare a componentelor. De exemplu, pentru solubilizarea unei soluții apoase de enzimă aceasta se amestecă cu o soluție de surfactant în solventul organic, rezultând o soluție clară.

Cei mai utilizați surfactanți în studiul enzimelor în microemulsii sunt cei de tip AOT (săruri de sodiu ale dioctilsulfosuccinatului), iar ca solvenți organici se folosesc hidrocarburile și hidrocarburile clorurate. În cadrul microemulsiilor nu se produc limitări ale transferului de masă datorită suprafeței interfazice mari și în anumite condiții pot fi incluse cantități mari de apă, ceea ce constituie un avantaj pentru reacțiile ce presupun atât reactanți hidrofili cât și hidrofobi.

În transformările preparative, prezența surfactantului poate crea probleme în timpul izolării produsului de reacție. Pentru eliminarea acestui inconvenient se folosesc reactoare cu membrană. Membrana este permeabilă pentru produsul de reacție, dar reține enzima și surfactantul în interiorul reactorului (Luisi și Laane, 1986).

În cazul în care substratul este hidrofob iar produsul este hidrofil, este avantajos să se lucreze într-un sistem de tip Winsor II constând într-o microemulsie de tip apă în ulei care coexistă cu o fază apoasă. În aceste condiții substratul și enzima se repartizează mai ales în microemulsie iar produsul în faza apoasă. Această metodă a fost utilizată pentru rezoluția esterului metilic al D,L-fenilalaninei, catalizată de chimotripsină (Towey ș.a., 1994). Pentru accelerarea reacției este recomandată intensificarea agitării amestecului creându-se astfel o emulsie, iar la întreruperea agitării are loc separarea fazelor.

Întrucât surfactantul poate cauza probleme la izolarea produsului și uneori determină inactivarea enzimei, s-a încercat și utilizarea unor microemulsii fără surfactanți. La amestecarea apei, hexanului și izopropanolului în proporții corespunzătoare formării unei microemulsii, activitatea catalitică a tripsinei a fost mult mai mare decât în alte amestecuri ale aceloraşi componente. S-a presupus că izopropanolul funcționează ca și surfactant, stabilizând picăturile de apă (Khmelnitsky ș.a., 1987).

4.1.3. Medii de reacție neconvenționale

Alături de mediile organice, există și alte posibilități neconvenționale de realizare a reacțiilor enzimatice. Dintre acestea, cele mai importante sunt reacțiile în fluide supercritice și reacțiile cu substratul în fază gazoasă.

Fluidele supercritice au fost folosite pentru reacțiile enzimatice într-un mare număr de studii. Din această categorie cel mai utilizat ca mediu de reacție a fost bioxidul de carbon supercritic ($SCCO_2$). Principalul avantaj al acestuia îl constituie faptul că acesta poate fi îndepărtat cu ușurință la sfârșitul reacției, doar prin scăderea presiunii și are toxicitate scăzută comparativ cu solvenții organici. Din acest motiv solvenții organici au fost înlocuiți cu bioxid de carbon supercritic și în anumite procese industriale. Ca solvent, bioxidul de carbon supercritic este asemănător cu hexanul și în consecință compușii hidrofobici pot fi dizolvați ușor în timp ce solubilitatea compușilor mai polari este mică. Enzimele nu sunt solubile în fluidele supercritice.

Un avantaj al utilizării fluidelor supercritice îl constituie difuzivitatea ridicată şi tensiunea superficială mică a acestora, ceea ce determină o rezistenţă scăzută la transferul de masă. Comparând din punct de vedere cinetic reacţiile enzimatice, s-a demonstrat că viteza de reacţie este apropiată în solvenţi organici şi în fluide supercritice. Dezavantajul utilizării fluidelor supercritice constă în necesitatea asigurării unor presiuni ridicate, fiind astfel necesar un echipament special.

O altă posibilitate neconvenţională de realizare a reacţiilor enzimatice este utilizarea substraturilor în fază gazoasă (Lamare şi Legoy, 1993). Preparatul enzimatic în fază solidă este situat într-o coloană peste care se trece substratul gazos. Printre enzimele folosite în acest mod au fost hidrogenazele, alcool oxidazele şi lipazele. Trebuie avut în vedere faptul că în această tehnică se pot utiliza doar enzime termostabile, întrucât este necesară o temperatură de reacţie ridicată pentru a menţine substratul în fază gazoasă. Ca şi în mediile de reacţie organice, activitatea apei din reactor are un rol important în activitatea catalitică a enzimei.

4.2. Parametrii care influenţează activitatea enzimelor în medii neapoase

Dintre parametrii care au o influenţă importantă asupra reacţiilor catalizate de enzime în medii neapoase, cele mai importante sunt conţinutul de apă şi natura solventului organic.

4.2.1. Efectul apei

Un aspect comun în toate studiile enzimelor în mediu organic îl constituie cantitatea de apă asociată cu enzima, care reprezintă un factor determinant al proprietăţilor enzimatice (activitate, stabilitate şi specificitate). Controlul cantităţii şi localizării apei este important pentru aplicaţiile sistemelor biocatalitice în medii neapoase. Apa este necesară pentru menţinerea conformaţiei catalitice a enzimei în solvenţi organici anhidri, dar în acelaşi timp poate cauza şi inactivarea acesteia.

Cantitatea de apă prezentă în mediul de reacţie influenţează enzima în diferite moduri. Chiar după liofilizare sau alte procedee de uscare, preparatul enzimatic conţine o cantitate de apă care este puternic legată de enzimă. Când reacţiile enzimatice au loc în mediu organic, apa este distribuită între fazele prezente în sistem: o parte din apă este legată de enzimă prin aceasta având o mare influenţă asupra activităţii catalitice, iar o parte este dizolvată în solvent sau legată de alte specii existente în mediul de reacţie.

Influenţa apei asupra activităţii enzimatice

Deşi conţinutul de apă în sistemele enzimatice neapoase este de obicei mai mic de 0,01%, variaţii mici ale acestuia determină schimbări majore ale activităţii catalitice. Se poate aprecia că enzima este complet inactivă în sisteme complet anhidre şi

activitatea ei crește cu creșterea gradului de hidratare al enzimei. Totuși, prea multă apă va facilita formarea unor agregate enzimatice care duc la scăderea activității enzimei. Mecanismul formării acestor agregate nu a fost elucidat în detaliu dar se presupune că formarea unor legături disulfidice intermoleculare are un rol important (Liu, Langer și Klibanov, 1991).

La adăugarea apei într-un sistem solvent-enzimă, aceasta se repartizează între solventul organic și enzimă. Activitatea enzimatică depinde de cantitatea de apă asociată enzimei și într-un grad mai mic de apa prezentă în tot sistemul. În mediu organic activitatea catalitică se menține atâta timp cât o cantitate minimă de apă este asociată cu enzima. Dependența dintre activitatea enzimatică și conținutul de apă va fi evident diferit pentru diverse enzime.

Cantitatea de apă necesară pentru cataliză depinde de natura enzimei. Lipazele au activitate ridicată când doar câteva molecule de apă sunt asociate cu molecula de proteină. Subtilizina și chimotripsina necesită mai puțin de 50 de molecule de apă la o moleculă de enzimă (Zaks și Klibanov, 1988). Alcool oxidaza, alcool dehidrogenaza și polifenol oxidaza sunt active când de molecula enzimei sunt legate sute de molecule de apă. Activitatea maximă în medii neapoase necesită fără îndoială nu doar o cantitate potrivită de apă ci și localizarea ei corectă. O dovadă în acest sens este că prin iradierea cu ultrasunete a subtilizinei s-a observat o creștere substanțială a activității enzimatice, probabil din cauza redistribuirii moleculelor de apă în enzimă.

Deși se pot utiliza și preparate enzimatice aproape anhidre în solvenți organici, s-a observat că în anumite cazuri prin adăugare de apă viteza de reacție poate să crească. Un asemenea exemplu este reacția de esterificare acidului butiric cu 1-pentanol, în izooctan (Peter, 1999). Se observă din Tabelul 4.2 că viteza de reacție a crescut de aproximativ 2,5 ori în momentul în care s-a ajuns la concentrația optimă de apă în sistemul de reacție și conversia alcoolului a fost, în mod corespunzător, mai ridicată.

Tabelul 4.2. Dependența vitezei inițiale de reacție și a conversiei de concentrația inițială a apei din sistem pentru esterificarea acidului butiric cu 1-pentanol, în prezența lipazei din pancreas de porc

Concentrația apei % (vol.)	Viteza inițială $mol \cdot l^{-1} \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$	Conversia*
0,07	0,33	0,25
0,12	0,35	0,26
0,17	0,54	0,41
0,27	0,78	0,54
0,37	0,84	0,56
0,47	0,97	0,62
0,57	0,92	0,58

*au fost calculate conversiile după 1h de reacție

S-a constatat că există o concentrație optimă de apă care dacă este depășită determină scăderea activității enzimatice. Este probabil ca apa să activeze enzima prin creșterea flexibilității interne a moleculei. De asemenea, apa poate să acționeze asupra substratului, în special în reacțiile catalizate de enzime hidrolitice.

Influența apei asupra mobilității proteinei

Adăugarea apei la preparatele enzimatice solide poate duce la creșterea activității prin accentuarea polarității și flexibilității centrului activ al enzimei. Studiile spectroscopice ale centrilor activi din alcool dehidrogenază și subtilizină au arătat că mobilitatea centrilor activi crește semnificativ cu adăugarea apei. Pentru subtilizină, creșterea flexibilității centrului activ a fost însoțită de creșterea polarității acestuia.

Pe de altă parte s-a constatat că în cazul subtilizinei în tetrahidrofuran-apă, o cantitate prea mare de apă induce formarea și creșterea unor agregate de apă în interiorul centrului activ, modificând structura enzimei și reducând activitatea catalitică (Affleck, ș.a., 1992).

Hidratarea grupărilor polare ale moleculelor proteice pare a fi o condiție esențială pentru cataliza enzimatică. Este posibil ca în stare uscată grupările polare din molecula enzimei să interacționeze una cu alta, rezultând o conformație inactivă. Rolul apei este de a forma legături de hidrogen cu aceste grupări funcționale prin aceasta ecranând interacțiunile electrostatice dintre grupările ionizate și neutralizând interacțiunile dipol-dipol dintre unitățile peptidice și grupările polare din lanțul polipeptidic pliat. Interacțiunile electrostatice pot fi determinante în comportarea enzimelor în mediu organic.

O parte dintre proprietățile noi ale enzimelor în mediul organic pot fi datorate conformației rigide în absența apei și aceste efecte se vor modifica prin introducerea apei în sistem. Adăugarea apei modifică "memoria moleculară" prin creșterea flexibilității proteice. O dovadă în acest sens poate fi considerată comportarea lipazei, care în stare uscată este extrem de stabilă la 100°C (timp de înjumătățire 12h) în heptanol/tributirină, activitatea ei dispare la adăugarea a numai 0,8% apă.

Influența activității apei asupra reacțiilor enzimatice în medii neapoase

La adăugarea apei într-un sistem enzimatic neapos, ea se distribuie între enzimă, solvent, substrat și suport (dacă acesta este prezent). Cantitatea de apă din amestecul de reacție poate fi determinată în diferite moduri, cea mai comună metodă fiind măsurarea concentrației de apă (% de volum sau mol/l). Totuși, datorită distribuției apei, concentrația totală de apă nu dă foarte multe informații privind hidratarea enzimei.

Din acest motiv, Halling a propus utilizarea activității termodinamice a apei (a_w) drept parametru pentru caracterizarea gradului de hidratare a sistemului biocatalitic în mediu organic și pentru corelarea nivelului apei asociate cu enzima (Halling, 1994).

Activitatea apei poate fi determinată prin raportarea presiunii vaporilor de apă din sistemul de reacţie la presiunea vaporilor de apă pură în aceleaşi condiţii. Menţinerea constantă a activităţii apei în diferiţi solvenţi organici poate fi obţinută în trei moduri:

- prepararea separată a soluţiei de substrat şi de enzimă într-o soluţie apoasă saturată cu sare, soluţii care se adaugă la solventul organic;
- introducerea directă a sării în sistemul de reacţie;
- adăugarea unor cantităţi de apă fixe, dar diferite pentru fiecare solvent;

Cea de-a doua metodă s-a folosit în cazul α-chimotripsinei (Kuhl şi Halling, 1991) şi lipazei (Kvittingen, ş.a., 1992).

Este util să se lucreze la o activitate constantă a apei, mai ales în cazul studiilor asupra influenţei solventului, pentru că în caz contrar efectele datorate diferenţelor de hidratare a enzimei vor influenţa puternic rezultatele.

Activitatea apei constituie un parametru important pentru activitatea catalitică a enzimelor. Acest lucru a fost demonstrat studiindu-se relaţia dintre activitatea catalitică şi activitatea apei (a_w) în diferiţi solvenţi pentru diferite substraturi. Atunci când activitatea apei nu este controlată, conţinutul optim de apă pentru a obţine o activitate catalitică maximă creşte cu creşterea polarităţii solventului. Acest lucru nu este întotdeauna valabil, pentru că în solvenţi de diverse polarităţi, de la hexan la pentanonă, lipaza a avut activitatea maximă la aceeaşi activitate optimă a apei, situată la aproximativ 0,55 (Valivety, Halling şi Macrae, 1992). Substraturile au de asemenea o afinitate puternică pentru apă, însă pentru esterificarea butanolului cu acid butiric în hexan catalizată de lipază s-a determinat aceeaşi activitate optimă a apei la $a_w = 0,78$, în condiţiile creşterii concentraţiei iniţiale a reactantului până la 0,37 M (Kvittingen ş.a., 1992).

Aceste rezultate arată clar existenţa unei relaţii dintre activitatea enzimatică şi activitatea apei şi în anumite circumstanţe această dependenţă este puternic influenţată de alte componente prezente în sistemul de reacţie. În multe sisteme proprietăţile solventului şi substratului influenţează direct şi / sau indirect activitatea enzimei. Aceasta se reflectă în variaţii ale vitezelor de reacţie, chiar şi atunci când activitatea apei este menţinută constantă (Halling, 1994).

Dependenţa dintre activitatea enzimei şi activitatea apei variază de la enzimă la enzimă. De exemplu, polifenol oxidaza şi α-chimotripsina au activitate maximă la o hidratare completă ($a_w = 1$, punct în care moleculele enzimei sunt înconjurate complet de un strat de apă), în timp ce lipaza din *Rhizomucor miehei* este foarte activă la $a_w < 0,0001$. Valorile optime ale a_w pentru alte lipaze variază între 0,12 şi 1,0. α-Chimotripsina sub formă de suspensie în solvenţi organici poate cataliza sinteza peptidelor când activitatea apei este controlată prin prezenţa unei sări hidratate ($Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$), deşi nici una dintre componentele sistemului (enzimă, substraturi, produşi şi sarea hidratată) nu se dizolvă în solventul organic. Explicaţia cea mai plauzibilă ar fi că reacţia are loc în stratul de apă care înconjoară moleculele de enzimă (Yang şi Russell, 1996).

Trebuie reținut faptul că o concentrație mică de apă (a_w scăzută) schimbă echilibrul termodinamic al reacțiilor catalizate de hidrolaze, de exemplu în cazul esterificărilor sau reacțiilor de sinteză ale peptidelor. Constanta de echilibru pentru esterificarea catalizată de lipază crește cu scăderea lui a_w. Pentru a realiza un compromis, ținând cont de vitezele de reacție scăzute observate la activități scăzute ale apei, este utilă inițierea reacției la a_w ridicată pentru obținerea unei viteze de reacție optime și apoi reducerea valorii a_w spre sfârșitul reacției pentru obținerea unor randamente bune (Svensson ș.a., 1994).

În general se recomandă ca cinetica reacțiilor enzimatice în solvenți organici să fie studiată la o valoare constantă a activității apei pentru a realiza același nivel de hidratre a enzimei și a elimina astfel influența apei. Această influență este însă mult mai complexă, fiind în mare măsură dependentă de natura enzimei și a solventului organic.

4.2.2. Efectul solventului

Influența solventului asupra apei asociate cu enzima

Natura solventului organic este un alt factor important în enzimologia în medii neapoase. Solventul nu numai că influențează, direct sau indirect, activitatea și stabilitatea enzimei ci modifică totodată specificitatea acesteia (specificitatea de substrat, enantio-, regio- și chemoselectivitatea). În general, un solvent influențează activitatea enzimei prin interacțiunea sa cu apa, enzima, substratul și produșii de reacție.

Deși unii solvenți par a avea un efect minim asupra moleculelor de apă legate de enzimă, solvenții hidrofili sunt capabili să extragă chiar și apa de pe suprafața enzimei, determinând o hidratare insuficientă a acesteia și implicit micșorând activitatea enzimatică. Efectul determinat de extragerea apei a fost studiat măsurându-se cantitatea de T_2O eliberată din trei enzime (chimotripsină, subtilizină și peroxidază) dispersate în diferiți solvenți (Gorman și Dordick, 1992). S-a găsit că desorbția T_2O se produce în toate enzimele și solvenții testați și a fost completă în câteva minute. Extragerea apei din enzimă de către un solvent a fost corelată cu polaritatea solventului ($1/\varepsilon$) și într-o măsură mai mică cu hidrofobicitatea acestuia (log P). De exemplu, metanolul desoarbe aproximativ 60% din apa legată de enzime în timp ce hexanul desoarbe numai 0,5%. În aceste condiții nu este surprinzător că în cazul reacției de esterificare catalizate de papaină s-a observat existența unei corelări liniare bune între cantitatea de apă optimă (pentru a obține o activitate optimă) și log P al solventului. Cantitatea de apă optimă a variat de la 4% în acetonitril la 0,05% în tetraclorură de carbon (Stevenson și Storer, 1991).

Extragerea apei din enzime de către solventul organic poate fi minimizată prin hidrofilizarea suprafeței enzimatice. De exemplu, prin modificarea covalentă a α-chimotripsinei cu dianhidridă piromelitică rezultă o stabilizare puternică a enzimei împotriva denaturării cauzate de solvenții organici (Khmelnitsky, ș.a., 1991).

Efectul solventului asupra enzimei

Mai multe studii au relevat faptul că conformaţia enzimei poate fi modificată la contactul acesteia cu solvenţii organici. Scăderea fluorescenţei resturilor de triptofan din peroxidază faţă de cele din L-triptofanul liber în dioxan indică o denaturare a enzimei în acest solvent. Totuşi, peroxidaza pare să-şi menţină integritatea structurală a centrilor săi activi într-o serie de alţi solvenţi organici. α-Chimotripsina este de asemenea denaturată într-un sistem apă-2,3-butandiol, fapt indicat prin modificări ale fluorescenţei (Yang şi Russell, 1996).

Solventul poate afecta activitatea enzimatică prin distrugerea unei anumite proporţii din numărul total de centri activi ai enzimei. S-a stabilit că situsurile active din α-chimotripsină nu sunt afectate în amestec de apă cu trei solvenţi aprotici, dioxan (32%), acetonă (14%) şi acetonitril (13%), în timp ce în octan anhidru numai 2/3 din numărul total de molecule de α-chimotripsină sunt catalitic active. Experimente ulterioare au arătat că această scădere a activităţii nu este cauzată numai de octan ci de procesul de liofilizare din timpul preparării enzimei. La evaluarea centrilor activi din structura α-chimotripsinei în mediul organic prin spectroscopie RMN s-a găsit că liofilizarea distruge aproximativ 42% din numărul centrilor activi iar introducerea solvenţilor anhidri determină distrugerea a încă 0-50% din aceştia, în funcţie de hidrofobicitatea solventului. De exemplu, distrugerea centrilor activi cauzată de octan şi dioxan a fost de 0, respectiv 29% (Burke, Griffin şi Klibanov, 1992). Aceasta ar putea fi rezultatul deshidratării şi/sau deplierii enzimei. Deşi scăderea activităţii enzimatice, observată de multe ori în medii organice comparativ cu cea în apă, poate fi explicată în parte prin distrugerea centrilor activi, nu este încă suficient de clar dacă acesta se datorează denaturării enzimei sau reducerii dinamicii moleculare.

Un mod alternativ de interacţiune dintre solvent şi enzimă este prin concurenţa cu substratul pentru legarea la centrul activ. Acest efect poate fi semnificativ mai ales când se utilizează solvenţi mai puţin polari. Astfel, moleculele solventului pot ajunge la centrul activ al enzimei scăzând local polaritatea acestuia şi având ca urmare mărirea respingerilor electrostatice dintre enzimă şi substrat. Această inhibiţie competitivă poate explica creşterea intensă a valorilor K_m în reacţii enzimatice în prezenţa solvenţilor organici, cum ar fi dioxanul şi acetonitrilul (Clement şi Bender, 1963).

Efectul solventului asupra substraturilor şi produşilor de reacţie

Solvenţii pot interacţiona direct sau indirect cu substraturile şi produşii de reacţie, afectând astfel activitatea enzimatică. Solvenţii pot să modifice concentraţiile substraturilor şi produşilor în stratul de apă ce înconjoară enzima şi întrucât substratul trebuie să penetreze stratul apos pentru ca reacţia să aibă loc iar produşii trebuie să fie eliminaţi pentru continuarea reacţiei, solventul va influenţa activitatea enzimatică.

4.3. Influența mediului organic asupra proprietăților enzimelor

Deși studiul catalizei enzimatice în solvenți organici a fost început în urmă cu peste 30 de ani, cercetările în acest domeniu au progresat lent până în 1980. Se știe acum că enzimele sunt catalitic active în solvenți organici datorită menținerii conformației lor native. Incapacitatea proteinei de a se deplia în medii neapoase rezultă pe de o parte din intensificarea interacțiunilor electrostatice în solvenți organici și pe de altă parte din creșterea rețelei de legături de hidrogen intramoleculare. Integritatea structurală a proteinei în medii neapoase a fost susținută de o serie de experimente ce includ ^{15}N RMN, ^{13}C RMN în stare solidă și cristalografie cu raze X (Zaks, 1996).

Stabilitatea proteinei în medii neapoase poate fi complet diferită de cea în apă. Întrucât moleculele de apă care înconjoară enzima în soluție apoasă contribuie cu forțe importante ce stabilizează conformația pliată, incluzând interacțiuni van der Waals și legături de hidrogen, îndepărtarea apei din jurul proteinei poate modifica stabilitatea acesteia. Similar, întrucât apa joacă un rol important în interacțiunile enzimă-substrat, este de așteptat ca specificitatea de substrat a enzimelor în medii organice să fie afectată.

Deși influența efectului de solvent asupra specificității și stabilității enzimelor a fost unanim acceptată, mecanismul stabilizării proteinei în solvenți organici și dependența parametrilor catalitici de caracteristicile solvenților nu au fost încă pe deplin elucidate.

4.3.1. Specificitatea enzimelor în medii neapoase

Specificitatea de substrat

Întrucât energia legăturii dintre enzimă și substrat este determinată de diferența dintre energia complexului enzimă-substrat și energia enzimei și a substratului în soluție interacționând cu moleculele solventului, ea este întotdeauna influențată de solvent. Zaks și Klibanov au stabilit că specificitatea de substrat a α-chimotripsinei, subtilizinei și esterazei se modifică substanțial la înlocuirea mediului apos cu mediul organic (Zaks și Klibanov, 1986). Interacțiunile hidrofobe au o contribuție importantă la legătura substratului cu chimotripsina în apă și s-a sugerat că inversarea specificității în solvenți organici s-a datorat lipsei acestor interacțiuni.

La studierea parametrilor esterificării în mediu organic a aminoacizilor N-acetilați catalizată de α-chimotripsină s-a constatat că în timp ce specificitatea enzimei pentru lanțul de aminoacizi a fost aproximativ aceeași în acetat de etil și acetonitril ca în apă, specificitatea pentru grupările N-protectoare a fost diferită, observându-se o viteză de reacție mai mare pentru derivații N-acetilați comparativ cu derivații protejați cu grupări N-benziloxicarbonil. Se pare că în mediu apos interacțiunile hidrofobe mai favorabile au fost responsabile pentru viteza ridicată a hidrolizei substraturilor care au grupări protectoare nepolare mai voluminoase. În solvenții organici, unde interacțiunile hidrofobe nu au nici un rol, se manifestă efectul favorabil al împiedicărilor sterice mai

mici în cazul substraturilor cu grupări N-protectoare mai puțin voluminoase, cum ar fi acetil (Clapes și Adlercreutz, 1991).

Lipsa interacțiunilor hidrofobe în medii neapoase este de asemenea responsabilă pentru modificarea specificității proteazei față de reactanții nucleofili în mediu organic. S-a demonstrat că reactivitatea grupării amino neprotejate din amidele aminoacizilor în reacțiile de transfer ale grupării acil în mediu apos a fost determinată în special de trecerea nucleofilului din mediul de reacție spre enzimă, fapt corelat foarte bine cu hidrofobicitatea nucleofilului. Pe de altă parte, specificitatea α-chimotripsinei față de aminoacizii amidați în solvenți organici nu a depins de hidrofobicitatea lor (Gololobov ș.a., 1992).

Deși influența mediului de reacție asupra specificității a fost demonstrată în special asupra lipazelor și proteazelor, numeroase studii indică faptul că aceste fenomene nu se limitează doar la enzimele hidrolitice. Astfel, pentru peroxidază dependența raportului V_{max}/K_M de hidrofobicitatea fenolilor p-substituiți în solvenți organici este diferită de cea în apă. În timp ce în mediu apos valorile V_{max}/K_M pentru metoxifenol și *terț*-butil fenol au fost aproximativ egale, ele au diferit de mai mult de 10 ori în acetat de butil.

Enantioselectivitatea

Enantioselectivitatea este probabil cea mai interesantă caracteristică a reacțiilor catalizate enzimatic și rezidă în capacitatea unică a enzimelor de a diferenția enantiomerii dintr-un amestec racemic. Ea are la bază diferența energiei libere a stării de tranziție pentru cei doi enantiomeri. Există câteva metode de a influența enantioselectivitatea reacțiilor enzimatice, cum ar fi utilizarea de inhibitori enantioselectivi, analogi de coenzime, săruri biliare, sau prin efectul temperaturii sau cosolvenților miscibili cu apa (Zaks, 1996).

Din păcate, enantioselectivitatea într-o anumită reacție depinde foarte mult de natura enzimei și găsirea enzimei celei mai potrivite necesită o muncă foarte laborioasă de testare a unui mare număr de biocatalizatori. Din acest motiv, faptul că enantioselectivitatea enzimelor este influențată de natura solventului este de mare importanță, întrucât permite realizarea unei selectivități dorite folosind o anumită enzimă disponibilă. De exemplu, stereoselectivitatea α-chimotripsinei în reacția de transesterificare enzimatică a 3-hidroxi-2-fenil propionatului cu propanol a diferit ca valoare de 20 de ori la utilizarea unor solvenți diferiți. Dacă în anumiți solvenți (diizopropil și ciclohexan) a fost preferat enantiomerul (*S*), în alții (acetonitril și acetat de metil) a fost preferat enantiomerul (*R*) (Klibanov, 2001).

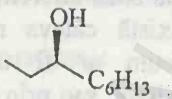
În cazul subtilizinei, s-a observat o corelare inversă între enantioselectivitatea subtilizinei în reacția de transesterificare a esterului cloroetilic al N-acetilalaninei cu propanol și hidrofobicitatea solventului, în sensul scăderii selectivității enzimei cu creșterea hidrofobicității solventului. Rezultatele au fost explicate pe baza observației că legarea substratului de enzimă este însoțită de eliberarea apei din enzimă și întrucât eliberarea moleculelor de apă într-un solvent hidrofob este defavorizată termodinamic,

reactivitatea L-enantiomerului în acești solvenți este puternic diminuată față de cea a D-enantiomerului.

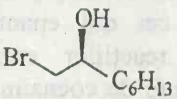
Nu numai efectele de solvent sunt importante pentru enantioselectivitatea reacțiilor în solvenții organici ci și efectele sterice și electronice ale grupărilor funcționale ale substratului.

Cea mai uzuală categorie de substraturi utilizate în reacțiile enantioselective catalizate de lipaze sunt alcoolii secundari și derivații lor. Pe baza observațiilor legate de enantioselectivitate s-a propus o regulă bazată pe mărimea substituenților, care sugerează că lipazele diferențiază enantiomerii alcoolilor secundari în primul rând pe baza mărimii celor doi substituenți. Aceasta este cunoscută ca regula lui Kazlauskas (Kazlauskas și Bornschauer, 1998). Chiar dacă nu este universal valabilă, pe baza ei se poate stabili care enantiomer al alcoolului secundar reacționează mai rapid într-o reacție catalizată de lipaze. S-a reușit astfel ca într-o serie de procese să fie îmbunătățită enantioselectivitatea lipazelor prin modificarea substraturilor, crescând mărimea substituentului mai voluminos (Rottici ș.a., 1997)

Pe lângă efectele sterice, efectele electronice au de asemenea o contribuție importantă. De exemplu, lipaza din *Candida antarctica B* prezintă o enantioselectivitate ridicată pentru 3-nonanol în reacția de acilare cu S-etil tiooctanoat catalizată de lipaza din *Candida antarctica* (coeficientul enantiomeric E > 300), dar scăzută pentru 1-bromo-2-octanol în aceleași condiții (E = 7,6). Grupările etil și bromoetil sunt apropiate ca mărime, deci diferența se pare că vine dintr-un efect electronic (Orrenius, ș.a., 1995).



E >300



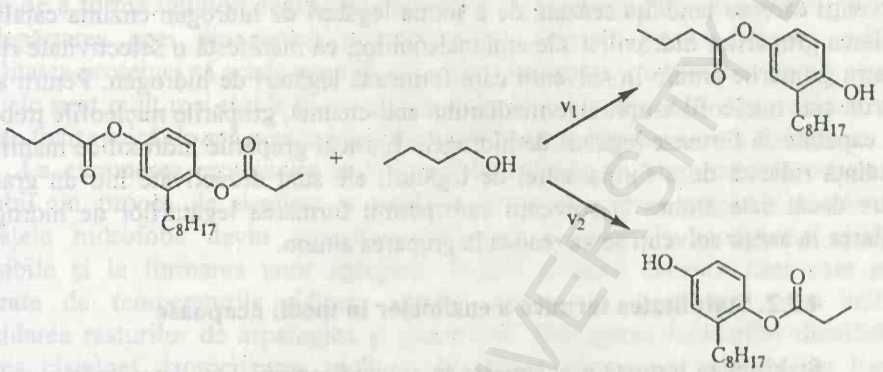
E = 7,6

Regioselectivitatea

Regioselectivitatea se referă la preferința enzimei pentru o anumită grupă funcțională dintre mai multe identice existente în strucura moleculei. Acest tip de selectivitate este foarte important în cazul hidraților de carbon sau al moleculelor aromatice. Totuși, numărul indicațiilor despre rolul solventului organic asupra regioselectivității este destul de redus.

Un exemplu de reacție în care a fost studiat efectul mediului de reacție asupra regioselectivității enzimei a fost transesterificarea esterului dibutiric al 2-octil-1,4-hidrochinonei cu butanol, catalizată de lipaza din *Pseudomonas cepacia* în solvenți organici S-a stabilit că raportul vitezelor de reacție pentru sinteza celor doi monoesteri (v_1/v_2) variază semnificativ în funcție de natura solventului organic . Mai mult, s-a realizat o corelare bună între factorul de regioselectivitate $(k_{cat} / K_M)_1 / (k_{cat} / K_M)_2$ și parametrul de hidrofobicitate al solventului, log P. Pentru explicarea acestui rezultat s-a presupus existența unei regiuni hidrofobe în vecinătatea centrului activ al enzimei.

Dacă reacția are loc astfel încât gruparea octil să ocupe acest spațiu, gruparea butiril vecină cu aceasta va fi plasată în centrul activ și se va forma compusul 1-hidroxi. Dacă reacția are loc astfel ca grupa butiril sa fie plasată în apropierea centrului activ, va fi favorizată formarea compusului 4-hidroxi. Întrucât în solvenții hidrofobi plasarea grupei octil în zona hidrofobă a enzimei nu este favorizată termodinamic, va avea loc formarea preferențială a compusului 4-hidroxi, în timp ce în solvenți hidrofili se va forma compusul 1-hidroxi (Rubio, Fernandez-Mayorales și Klibanov, 1991).



În reacția de hidroliză a zaharurilor acilate, esterul de la atomul de carbon anomer (hidroxilul secundar) reacționează primul, urmat de esterul de la hidroxilul primar. În reacția de acilare, primul care reacționează este hidroxilul primar și apoi cel secundar. Reactivitatea relativă între grupările hidroxilice secundare este dificilă de generalizat întrucât variază cu tipul lipazei, condițiile de reacție și structura hidratului de carbon.

Chemoselectivitatea

Chemoselectivitatea, care constă în capacitatea enzimelor de a diferenția grupările funcționale ale substratului, este o altă proprietate enzimatică ce poate fi afectată de mediul de reacție. Pentru o serie de enzime, mai ales lipaze și proteaze, s-a demonstrat că preferința pentru o grupare hidroxil în detrimentul unei grupări amino depinde foarte mult de solventul organic utilizat ca mediu de reacție.

Astfel, în reacția de acilare catalizată de lipaza din *Aspergillus niger* a 6-amino-1-hexanolului s-a observat o preferință puternică pentru gruparea hidroxilică (Chinski, Margolin și Klibanov, 1989). Și pentru acilarea altor aminoalcooli în solvenți organici diferiți s-a constatat că raportul vitezelor de *O*-acilare și *N*-acilare este dependent de solvent. Această selectivitate neașteptată, diferită de cea înregistrată în reacții chimice clasice, a permis obținerea unui număr mare de monoesteri cu randamente bune, fără a fi necesară protejarea grupărilor amino (Tawaki și Klibanov, 1993)

De exemplu, chemoselectivitatea lipazei din *Pseudomonas* sp. în reacția de acilare a N-α-benzoil-L-lizinolului cu butirat de trifluoroetil a variat de la 1,1 în alcool *terț*-butilic la 21 în 1,2-dicloretan, grupa hidroxil fiind mult mai reactivă decât grupa amino în toți solvenții testați.

În mod surprinzător în aceiași solvenți o altă lipază, cea din *Mucor miehei,* a prezentat selectivitate pentru gruparea amino. Explicația acestui fapt rezidă în legătura dintre chemoselectivitatea lipazei și existența legăturilor de hidrogen: în timp ce în solvenții care au tendință scăzută de a forma legături de hidrogen enzima catalizează acilarea grupărilor hidroxilice ale aminoalcoolilor, ea manifestă o selectivitate ridicată pentru grupările amino în solvenții care formează legături de hidrogen. Pentru a avea loc un atac nucleofil asupra intermediarului acil-enzimă, grupările nucleofile trebuie să fie capabile să formeze legături de hidrogen. Întrucât grupările hidroxilice manifestă o tendință ridicată de a forma astfel de legături, ele sunt dezactivate într-un grad mai mare decât cele amino în solvenții care permit formarea legăturilor de hidrogen și acilarea în acești solvenți se va realiza la gruparea amino.

4.3.2. Stabilitatea termică a enzimelor în medii neapoase

Stabilitatea termică a enzimelor în solvenți organici se datorează unor factori cum ar fi hidratarea proteinei și dinamica acesteia, interacțiunile proteină-solvent și contribuția solventului la stabilitatea termodinamică a proteinei.

Este unanim acceptat faptul că moleculele de apă care înconjoară proteinele au o contribuție majoră la stabilitatea lor. Apa joacă un rol important în interacțiunile hidrofobe care reprezintă forța majoră în stabilitatea proteinelor în soluții apoase, contribuții având de asemenea interacțiunile van der Waals și legăturile de hidrogen.

Deși o evaluare cantitativă a contribuției apei la stabilitatea proteinei este foarte complexă, efectul îndepărtării apei din proteină poate fi estimat cantitativ. Întrucât interacțiunile hidrofobe sunt determinate de reorganizarea rețelei legăturilor de hidrogen din moleculele de apă, îndepărtarea apei de la suprafața proteinei duce la diminuarea efectelor hidrofobe și destabilizează proteina. Invers, deshidratarea proteinei mărește contribuția legăturilor de hidrogen la stabilitatea proteinei. Similar cu celelalte forțe, energia legăturilor de hidrogen reprezintă diferența dintre energia moleculelor din soluție care interacționează cu apa și cea a moleculelor din complexul proteic care reacționează între ele. Îndepărtarea apei din sistem este însoțită de o reducere a numărului total de legături de hidrogen intermoleculare dintre apă și molecula proteică. Aceasta determină stabilizarea legăturilor de hidrogen intramoleculare și în consecință creșterea rigidității proteinei.

Consecințele îndepărtării apei din proteină asupra interacțiunilor electrostatice sunt mult mai complexe. În general este acceptată ideea conform căreia interacțiunile electrostatice din proteină sunt intensificate de o serie de factori printre care o importanță deosebită o are și factorul entropic. Factorul entropic este atribuit moleculelor de apă care determină formarea unei structuri mai puțin ordonate dar mai favorizată din punct de vedere energetic, când grupările funcționale încărcate

expulzează apa în soluție în timpul procesului de pliere. Îndepărtarea apei din jurul proteinei reduce contribuția factorului entropic ducând la stabilizarea globală a enzimei.

Inactivarea termică ireversibilă a enzimelor în medii apoase este de obicei precedată de o depliere reversibilă, proces care necesită mobilitate conformațională. În această privință, efectul hidratării asupra dinamicii proteinei devine de primă importanță. Abilitatea apei de a mări flexibilitatea proteinei rezultă din tendința ei ridicată de a forma multiple legături de hidrogen cu proteina. Este de așteptat deci, ca la îndepărtarea apei din sistem sau înlocuirea acesteia cu un solvent organic flexibilitatea proteinei să scadă semnificativ. Este important de subliniat faptul că deși proteinele sunt mult mai rigide în condiții anhidre decât în apă, este necesară numai o cantitate foarte mică de apă pentru a induce mobilitatea proteică (Zaks, 1996).

La expunerea proteinelor la temperaturi ridicate în timp îndelungat are loc inevitabil un proces de depliere a acestora în urma căruia grupările reactive și suprafețele hidrofobe devin accesibile. Aceasta conduce la modificări chimice ireversibile și la formarea unor agregate. Aceste procese chimice care sunt mult accelerate de temperaturile ridicate conduc adesea la inactivare, care include dezamidarea resturilor de asparagină și glutamină, distrugerea legăturilor disulfidice, oxidarea cisteinei, izomerizarea prolinei etc. Multe din aceste procese au loc în prezența apei și de aceea nu se produc în medii de solvenți organici anhidri. Mai mult, creșterea rigidității proteinei în solvenți anhidri împiedică orice proces de depliere reversibilă, care de asemenea contribuie la stabilitatea termică.

Observațiile experimentale confirmă faptul că un număr mare de enzime prezintă o termostabilitate superioară în solvenți organici față de cea din soluțiile apoase. De exemplu, lipaza pancreatică de porc a prezentat o stabilitate remarcabilă în mediu organic anhidru cu un timp de înjumătățire a activității de 12 h la 100°C, față de o soluție tampon în care enzima s-a dezactivat aproape instantaneu la aceeași temperatură. Stabilitatea termică a fost dependentă de concentrația apei: în prezența a 1% apă în mediul organic, stabilitatea lipazei a fost aproape identică cu cea avută în soluții apoase. Și alte enzime prezintă o îmbunătățire a termostabilității în medii neapoase. Timpul de înjumătățire a activității chimotripsinei la 100° C în octan anhidru a fost 270 minute, comparativ cu numai 15 minute în soluție apoasă la pH = 8,0 și 55°C.

Creșterea rigidității structurale și viteza mai mică a deteriorării chimice sunt responsabile pentru stabilitatea termică ridicată a celor mai multe proteine în solvenți organici. Totuși, expunerea prelungită a acestora la temperaturi ridicate chiar și în solvenți organici anhidri duce la inactivarea lor. Întrucât solvenții hidrofobi sunt mai inerți în ceea ce privește interacțiunile lor cu proteinele, termostabilitatea acestora în medii hidrofobe este de obicei mai mare decât în medii hidrofile (Zaks și Klibanov, 1984).

5. BIOCATALIZĂ CU LIPAZE

În acest capitol se va face o prezentare mai detaliată a lipazelor, care reprezintă enzimele cele mai importante din punct de vedere al aplicațiilor în chimia organică. Lipazele (E.C. 3.1.1.3) sunt enzime care fac parte din clasa hidrolazelor, având un rol important în metabolismul grăsimilor. Ele hidrolizează grăsimi și uleiuri cu formare de acizi grași liberi, gliceride parțiale și glicerină. Trebuie menționat însă că există destule confuzii cu privire la semnificația exactă a termenilor de lipază și esterază, întrucât ambele hidrolizează legăturile esterice ale acizilor carboxilici. Confuzia provine și din faptul că mulți cercetători au utilizat enzime nepurificate care conțineau probabil și lipază și esterază, sau au folosit substraturi neemulsionate sau chiar solubile.

Conform nomenclaturii adoptate de Uniunea Internațională de Biochimie, lipaza catalizează reacția (Shahani, 1985):

$$\text{Trigliceridă} + H_2O \xrightarrow{\text{lipază}} \text{Digliceridă} + \text{Acid gras}$$

Această definiție nu este completă din mai multe motive:

- reacția de hidroliză poate continua până la obținerea de monogliceride și chiar glicerină.
- nu ține cont de faptul că lipaza poate hidroliza și esteri ai acizilor carboxilici inferiori cu glicerina, sau esteri ai acizilor grași cu alți alcooli.

Unii cercetători consideră că deosebirea esențială dintre lipaze și esteraze constă în starea fizică a substratului asupra căruia acționează. Astfel, esterazele pot hidroliza substraturi solubile sau dispersate total, iar lipazele nu. De aceea s-a propus de către Wills și Jensen să se definească lipazele drept enzime care hidrolizează esterii la o interfață de tip ulei-apă, într-un mediu insolubil sau eterogen. Ulterior, s-a considerat că principala diferență între esteraze și lipaze este fenomenul activării la interfață, care este specific lipazelor, dar nu și esterazelor (Bornscheuer, 2002)

Trebuie menționat și faptul că s-a demonstrat că lipazele pot îndeplini un rol catalitic într-o serie de alte reacții cum ar fi esterificări, transesterificări, aminolize, ceea ce poate fi de mare importanță practică, așa cum se va arăta în continuare.

După proveniența lor, lipazele se pot clasifica astfel (Brockerhoff, 1974):

- lipaze de origine microbiană
- lipaze din plante
- lipaze din lapte
- lipaze pancreatice
- lipoprotein-lipaze
- lipaze hormon-senzitive

Dintre acestea, importanță pentru utilizarea drept biocatalizatori prezintă lipazele microbiene și pancreatice.

5.1. Obținerea, purificarea și caracterizarea lipazelor

5.1.1. Obținerea și purificarea lipazelor din culturi microbiene

Lipaze microbiene sunt produse de o serie de specii de bacterii, ciuperci (fungi) și drojdii. Cele mai importante microorganisme producătoare de lipază, împreună cu activitățile lipazice maxime obținute în mediile de cultură și condițiile de determinare a activității, sunt prezentate în Tabelul 5.1 (Frost și Moss, 1987).

Tabelul 5.1. Surse de lipaze microbiene

Specia microbiană	Modalitatea de biosinteză	Activitatea (UE[a]/ml)	Condiții[c]
A. Bacterii			
Staphylococcus aureus	flacoane agitate	4,5	37°C, pH 8,0
Pseudomonas nitroreducens	fermentator 2 l	500,0	37°C, pH 9,0
Pseudomonas fragi	fermentator 20 l	75,0	37°C, pH 9,0
Alcaligenes species	fermentator 15 l	800,0	37°C, pH 8,7
Bacillus licheniformis	flacoane agitate	6,0	45°C, pH 8,5
B. Drojdii			
Candida cylindracea	flacoane agitate	[b]	30°C, pH 7,0
Saccharomycopsis lipolytica	flacoane agitate	40,0	30°C, pH 9,5
Candida lipolytica	fermentator 2 l	1,0	37°C, pH 8,2
C. Fungi			
Aspergillus luchnensis	mediu solid	-	40°C, pH 7,0
Aspergillus niger	flacoane agitate	4,0	37°C, pH 6,5
Rhizopus delemar	submers	60,0	30°C, pH 5,6
Rhizopus arrhizus	fermentator 100 l	350,0	37°C, pH 7,5
Rhizopus delemar	fermentator de tip turn și fermentator 3 l	460,0	30°C, pH 8,5
Geothricum candidum	cultură lichidă statică	6,0	32°C, pH 8,5
Geothricum candidum	flacoane agitate	170,0	30°C, pH 5,6
Mucor lipolyticus	flacoane agitate	90,0	37°C, pH 8,0
Humicola lanuginosa	fermentator 600 l	55,0	45°C, pH 8,0
Phycomyces species	fermentator	160,0	37°C, pH 7,0
Penicillium funiculosum	flacoane agitate	[b]	37°C, pH 8,0

[a]1 UE (unitate enzimatică) = cantitatea de enzimă care determină eliberarea unui μmol acid gras pe minut, în condiții date.

[b]Activitatea enzimatică este exprimată în unități ce nu au putut fi convertite în UE.

[c] Drept substrat pentru determinarea activității s-a utilizat în toate cazurile uleiul de măsline

Este un fenomen frecvent ca o singură tulpină să producă mai multe enzime, acestea putând avea origine genetică diferită sau fiind produse drept rezultat al modificării unei singure proteine. Astfel, Iwai și Tsujisaka au identificat trei lipaze (A, B și C) în filtratul unei culturi de *Rhizopus delemar* (Iwai și Tsujisaka, 1974). După

purificarea acestor enzime ei au stabilit că lipazele B şi C sunt forme diferite ale aceleiaşi proteine, în timp ce lipaza A este o proteină diferită.

În mod uzual, lipazele microbiene sunt enzime extracelulare. Lipazele extracelulare pot fi obţinute din culturi tinere, de preferinţă în timpul fazei de creştere logaritmică a celulelor, fiindcă atunci sunt mai puţin afectate de liza celulelor. În cazul unor sisteme ce produc lipaze extracelulare, o mică parte a enzimei apare ca fiind legată de celulă. Anumiţi cercetători au raportat existenţa şi a unor lipaze intracelulare, cum ar fi cele produse de bacterii din speciile *Escherichia coli, Streptococcus thermophilus* şi *Streptococcus lactis* (Bloquel şi Veillet-Poncet, 1984), drojdii din specia *Saccharomycopsis lipolytica* (Ota ş.a., 1982), sau fungi din specia *Rhizopus chinensis* (Nakashima ş.a., 1989).

Capacitatea de a produce lipaze pare a fi o proprietate a majorităţii bacteriilor, în condiţii potrivite, cu toate că productivitatea variază considerabil, chiar în cadrul tulpinilor provenite de la aceeaşi specie de microorganism.

Parametrii care influenţează biosinteza lipazei sunt în general cunoscuţi, dar acţiunea lor nu este în mod obligatoriu aceeaşi.

Lipazele de origine fungică au fost obţinute atât din culturi pe medii solide cât şi din culturi submerse.

5.1.1.1. Culturi pe medii solide

Un procedeu de cultură pe mediu solid a fost descris încă în 1949 de către Smythe şi Drake pentru lipaza din *Aspergillus luchensis*. Mai târziu, un grup de cercetători japonezi au obţinut lipază din *Aspergillus niger* tot din culturi pe mediu solid, dar ulterior ei au considerat că alegerea tipului de cultură trebuie făcută în funcţie de tulpina utilizată (Frost şi Moss, 1987). În general însă numărul referinţelor privitoare la obţinerea de lipaze din culturi pe medii solide este scăzut.

Cercetători mexicani a studiat obţinerea lipazei microbiene din culturi pe medii solide, utilizând tărâţe de grâu drept sursă de azot şi carbon, KH_2PO_4, K_2HPO_4 şi $MgSO_4$ ca săruri minerale (Rivera Munoz ş.a., 1991). Umiditatea iniţială a sistemului a fost de 50%, iar temperatura culturii s-a menţinut la 29°C. Dintre fungii filamentoşi testaţi, rezultate bune s-au obţinut cu *Mucor miehei, Penicillium camemberti* şi *Penicillium candidum*. Efectuându-se un studiu comparativ faţă de culturile submerse, în cazul lipazei din *Penicillium candidum*, autorii consideră culturile pe mediu solid drept o alternativă viabilă pentru obţinerea lipazelor microbiene.

5.1.1.2. Culturi submerse

Majoritatea cercetărilor au stabilit că lipazele se pot obţine cel mai avantajos din culturi submerse aerate. În continuare vor fi analizate aceste tipuri de culturi, cu accent pe principalii parametri care influenţează biosinteza: compoziţia mediului de cultură, temperatura, pH-ul, aerarea mediului, faza de dezvoltare a celulelor.

Influența compoziției mediului de cultură

Tipul și concentrația componenților mediului de cultură pentru biosinteza lipazei diferă foarte mult de la o tulpină la alta și este susceptibilă unor optimizări ulterioare. Aceste medii conțin în general drept sursă de carbon un hidrat de carbon simplu sau complex, însă unele drojdii producătoare de lipază pot fi cultivate de asemenea pe uleiuri sau hidrocarburi. Producția de lipază în general nu depinde decât în mică măsură de natura hidratului de carbon utilizat.

O altă problemă importantă este natura sursei de azot și realizarea unui raport optim azot/carbon în mediul de cultură. Tsujisaka ș.a. au sugerat că lipazele fungice necesită în cursul fermentației concentrații de azot mai mari decât alte enzime (Sztajer și Maliszewska, 1984).

O serie de surse au semnalat că lipaza se obține cel mai bine dacă microorganismul este crescut pe un mediu conținând peptonă. Anumite tipuri de peptone sunt mai puțin potrivite ca și constituienți ai mediului de cultură decât altele, cu toate că dezvoltarea microorganismului nu este afectată. Conform datelor de literatură, randamentul lipazei obținute a crescut considerabil dacă mediul a avut în compoziție hidrolizat de cazeină, triptonă, polipeptonă, casitonă sau făină de soia (Bloquel și Veillet-Poncet, 1984).

În cazul lipazei din *Penicillium citrinum* sursa de carbon optimă s-a determinat a fi amidonul, în timp ce ca sursă de azot peptona în concentrație de 5% a dat cele mai bune rezultate, ureea și sulfatul de amoniu dovedindu-se ineficiente (Sztajer și Maliszewska, 1984).

Rhizopus chinensis produce o lipază intracelulară dacă se folosește drept sursă de azot polipeptonă sau extractul de carne (Nakashima ș.a., 1989), iar *Rhizopus microsporus* produce randamentul maxim în lipază dacă mediul conține autolizat de drojdie 0,1% și drojdie furajeră 0,25% (Zubenko, Sultanova și Zakirov, 1978).

În cazul biosintezei lipazei din *Pseudomonas* sp. cea mai potrivită sursă de azot s-a dovedit a fi ureea. Dacă pentru obținerea lipazei se folosește *Candida lipolytica*, rezultatele cercetărilor indică drept sursă de azot sulfatul de amoniu și ureea.

Un mare număr de cercetători au studiat obținerea lipazelor pe medii sintetice sau semisintetice, care conțin adaosuri de diferiți compuși chimici alături de, sau înlocuind mediile naturale (Bloquel și Veillet-Poncet, 1984).

Astfel, un studiu comparativ efectuat pe 41 de medii diferite a dus la formularea unui mediu sintetic pentru biosinteza lipazei din *Pseudomonas fragi* prin înlocuirea peptonei cu un amestec de arginină, lizină, acid aspartic și acid glutamic. S-au obținut randamente în lipază de aproape 90% față de cele obținute pe mediul cu peptonă. Alte cercetări au stabilit că adăugarea unor aminoacizi: leucină, izoleucină și valină determină creșterea producției de lipază din *Pseudomonas fragi*. Producția lipazei din *Pseudomonas aeruginosa* a fost stimulată prin introducerea de alanină în mediul de cultură (Frost și Moss, 1987).

Nadkarni a utilizat medii semisintetice conținând aminoacizi, glucoză și extract de drojdie, stabilind că arginina, acidul glutamic și triptofanul determină creșterea

biosintezei lipazei, în timp ce prezența glucozei în mediu favorizează acumularea timpurie a lipazei și scurtează timpul de incubare necesar. Alți cercetători au stabilit pentru *Pseudomonas fluorescens* un mediu optim de cultură conținând polipeptonă, glucoză, uree și componente minerale.

Prezența în mediu a unor săruri anorganice duce de asemenea la creșterea randamentului biosintezei lipazei din *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Acinetobacter* sp. În ceea ce privește acțiunea vitaminelor asupra biosintezei lipazei, datele de literatură sunt contradictorii, unele menționând că adăugarea de vitamine nu a avut efect asupra producției de lipază, contrar celor afirmate de alți cercetători (Bloquel și Veillet-Poncet, 1984).

Bacterii Gram-negative din specia *Acinetobacter*, izolate din sedimentele din apă, produc o lipază extracelulară dacă sunt cultivate la 20°C pe un mediu complex conținând peptonă 2% și extract de drojdie 0,15%. Dacă s-a folosit un mediu de cultură constituit din amestec de aminoacizi sintetici sau hidrolizat de cazeină împreună cu vitamine nu s-a înregistrat activitate lipazică. Totuși, dacă la aceste medii s-a adăugat taurocolat de sodiu, s-a obținut lipază, cel mai mare randament înregistrându-se dacă în sistem a fost prezent și un amestec de di- și polipeptide (Breuil și Kushner, 1975).

Prezența lipidelor în mediul de cultură poate induce, iar în alte cazuri poate inhiba producerea lipazei. Chander și alții au constatat că adăugarea de lipide în mediul de cultură pentru biosinteza lipazelor din *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium solani* și *Geothricum candidum* inhibă creșterea microorganismelor și determină scăderea producției de lipază (Bloquel și Veillet-Poncet, 1984). În ce privește lipaza din *Mucor mucedo*, s-a constatat că introducerea de lipide în mediul de cultură are un efect diferențiat. Dintre trigliceridele testate (în concentrație de 0,1% raportat la mediul de bază), tributirina a determinat creșterea producției de lipază cu 66 %, în timp ce trigliceridele conținând acizi grași nesaturați cu catenă lungă (ulei de măsline, ulei de floarea-soarelui, ulei de muștar, etc.) au avut o acțiune ușor inhibitoare. Efectul inhibitor cel mai puternic l-a avut trioleina, care a cauzat o reducere cu 58% a producției de lipază. Creșterea randamentului în lipază în prezența tributirinei a fost raportată și pentru *Penicillium roqueforti*, în timp ce prezența uleiului de porumb și a celui de măsline determină inhibarea acestuia cu 21, respectiv 29% (Chander și Klostermeyer, 1982).

Drept medii de cultură pentru obținerea lipazelor au fost utilizate și anumite hidrocarburi. Astfel, o cultură de *Candida lipolytica* izolată dintr-o probă de sol îmbibată cu țiței s-a dovedit a fi capabilă de a produce lipază în condițiile cultivării pe un mediu conținând 4% cherozină drept sursă de carbon. Atât creșterea microorganismului cât și producerea enzimei au fost favorizate de adăugarea în mediu a 2% ulei de măsline drept sursă adițională de carbon. Dintre sursele de azot utilizate, ureea s-a dovedit a fi ușor superioară sulfatului de amoniu (Kosaric ș.a., 1979).

Una din sursele cele mai importante de lipază pentru biotehnologii este *Aspergillus niger*, care are avantajul de a fi o specie nepatogenă și foarte bine caracterizată, fiind folosită pentru obținerea unui mare număr de enzime, chiar la scară industrială de exemplu în cazul amiloglucozidazei. Un studiu cuprinzător referitor la

biosinteza lipazei din culturi submerse de *Aspergillus niger* a stabilit compoziția optimă a mediului de cultură, constituit din 0,1% NH_4NO_3, 0,2% KH_2PO_4, 0,04% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1% zaharoză și 1% ulei de măsline. S-a determinat că sursa optimă de carbon este zaharoza. Glucoza, maltoza și fructoza determină o creștere bună a miceliului, dar randamentul în lipază este mai scăzut, în timp ce xiloza, rafinoza, citratul și acetatul de sodiu determină doar o slabă creștere a ciupercii, fără a se produce lipază. Dintre sursele de azot, cea mai bună a fost azotatul de amoniu, concentrația ei optimă în mediul de cultură fiind 0,1%. În aceeași cultură a fost determinată și influența sărurilor minerale. În cazul acestei tulpini prezența ionilor Fe^{2+} și Mg^{2+} favorizează producerea lipazei. Concentrațiile optime determinate au fost 0,1% pentru $FeSO_4$ și 0,04% pentru $MgSO_4$. Ionii de K^+, Na^+ și Ca^{2+} nu influențează randamentul în enzimă. Necesitatea utilizării unei surse de fosfat în mediul de cultură nu este menționată decât rareori în cazurile citate din literatura de specialitate, fiind indicat fosfatul de amoniu monoacid. În cazul acestei tulpini de *Aspergillus niger* însă prezența KH_2PO_4 în concentrație de 0,2% duce la obținerea de randamente mai bune decât cele obținute cu $(NH_4)_2HPO_4$ (Pal, Das și Kundu, 1978).

Într-un alt studiu, referitor la biosinteza lipazei din culturi de *Aspergillus niger* pe medii solide și lichide, cea mai mare activitate în mediul de cultură s-a obținut utilizînd un mediu solid conținând tărâțe de grâu 65%, coji de orez 34,5% și ulei de măsline 0,5%, dar cultura pe mediul lichid cu compoziția ulei de măsline 1%, zaharoză 1%, NH_4NO_3 0,1%, KH_2PO_4 0,2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,04% și $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1% a avut productivitate mai mare în enzimă (Peter, Anghel și Bota, 1995).

Un caz mai special l-a constituit încercarea unor cercetători japonezi de a obține o lipază microbiană care să aibă proprietățile caracteristice lipazei pancreatice. Sursa căutată s-a dovedit a fi o bacterie Gram negativă din specia *Alcaligenes*. Sursa de carbon optimă pentru cultura acesteia a fost fructoza (în concentrație de 1,25%), iar ca sursă de azot cele mai bune rezultate le-a dat $NaNO_3$ (în concentrație de 0,75%). De asemenea, s-a stabilit că prezența în mediu a unor agenți activi de suprafață favorizează producerea lipazei, cel mai eficient dovedindu-se polioxietilen-stearil-eterul în concentrație de 0,5%. Dintre sărurile minerale, $FeSO_4$ și $FeCl_3$ au favorizat biosinteza enzimei, în timp ce $CoCl_2$ a avut o puternică acțiune inhibitoare (Kokusho, Machida și Iwasaki, 1982).

Influența temperaturii

În afară de compoziția mediului de cultură, producerea lipazei este influențată de o serie de alți factori, în primul rând parametrii fizico-chimici care caracterizează cultura.

Temperatura optimă pentru biosinteza lipazei diferă de la o specie la alta. Astfel, pentru specia *Pseudomonas* temperatura optimă se situează în general în domeniul 20-30°C. Totuși, pentru *Pseudomonas mephitica* var. *lipolytica* producția maximă de lipază s-a observat la 37°C, în timp ce pentru *Pseudomonas fragi* randamentul maxim în lipază s-a obținut menținând cultura timp de 3 zile la 15°C, la 30°C

neobservându-se activitate lipazică. În cazul culturilor de *Geothricum candidum* şi *Rhizopus nigricans* randamentele maxime în lipază s-au înregistrat la 30°C, iar la *Penicillium roqueforti* temperatura optimă a fost de 27°C (Bloquel şi Veillet-Poncet, 1984).

Obţinerea lipazei din *Aspergillus niger* a avut loc cu randament maxim la 35°C (Pal, Das şi Kundu, 1978). În cazul lipazei din *Mucor mucedo*, randamentul optim s-a obţinut prin menţinerea culturii timp de 3 zile la 30°C (Chander şi Klostermeyer, 1982), în timp ce în cazul unei tulpini de *Penicillium citrinum* temperatura optimă de incubare a fost 22°C (Sztajer şi Maliszewska, 1984).

Influenţa pH-ului

pH-ul iniţial al mediului de cultură reprezintă de asemenea un parametru important pentru producerea de lipază. Pentru o serie de microorganisme producătoare de lipază: *Pseudomonas fragi*, *Rhizopus arrhizus*, *Achromobacter lipolyticum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, sunt indicate valori iniţiale neutre ale pH-ului mediului (Bloquel şi Veillet-Poncet, 1984). Pentru *Acinetobacter* sp., la valoarea pH-ului de 6,6 se obţine randament maxim în lipază, însă dacă valoarea pH-ului scade la 6,0, producerea lipazei este inhibată (Breuil şi Kushner, 1975).

În cazul biosintezei lipazei din *Penicillium citrinum* randament bun în lipază s-a obţinut doar la pH neutru (pH optim 7,2), activitatea lipazică în mediu scăzând de 8-10 ori chiar la modificări relativ mici ale pH-ului, la 6 şi respectiv 8 (Sztajer şi Maliszewska, 1984).

Randamentul maxim în lipază pentru culturile de *Mucor mucedo* s-a obţinut la pH 7, ca şi pentru *Penicillium camemberti*, în timp ce datele furnizate pentru *Rhizopus nigricans* indică un pH optim de 6 (Chander şi Klostermeyer, 1982).

În cazul culturilor submerse de *Aspergillus niger*, activitatea lipazică cea mai mare în mediu s-a obţinut de asemenea la pH neutru (Pal, Das şi Kundu, 1978).

La obţinerea lipazei alcaline din culturi de *Alcaligenes* sp. pH-ul final al mediului de cultură se situează în domeniul bazic, între 8,0-8,7 (Kokusho, Machida şi Iwasaki, 1982).

Influenţa aerării

Cercetările au evidenţiat creşterea producerii de lipază în cazul culturilor aerate pentru majoritatea microorganismelor producătoare de lipază, însă gradul de aerare necesar pare să difere de la o specie la alta. Chander şi alţii au constatat accelerarea dezvoltării celulelor şi a producerii de lipază în culturi agitate de *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. şi *Geothricum* sp. Alţi cercetători au constatat acelaşi lucru pentru *Penicillium roqueforti* şi *Pseudomonas mephitica* var. *lipolytica* (Bloquel şi Veillet-Poncet, 1984).

În cazul lipazei din *Mucor mucedo* activitatea lipazei pentru culturi în flacoane agitate a fost mai mare cu 40% decât în cazul flacoanelor neagitate (Chander şi Klostermeyer, 1982).

Efectul aerării nu este însă întotdeauna pozitiv asupra producţiei de lipază. S-a constatat de exemplu că în cazul culturilor de *Pseudomonas fragi*, aerarea intensă determină reducerea activităţii lipazice. În cazul microorganismelor *Candida lipolytica*, *Pseudomonas fragi* şi *Pseudomonas fluorescens* s-a observat că utilizând culturi agitate se obţine o creştere mai pronunţată a celulelor şi în faza iniţială o creştere a producţiei de lipază, urmată însă de o scădere rapidă a activităţii lipazice în cazul continuării agitării (Bloquel şi Veillet-Poncet, 1984).

Un studiu efectuat asupra influenţei concentraţiei de oxigen asupra producţiei de lipază din culturi de *Rhizopus delemar* a arătat că concentraţii scăzute de oxigen afectează negativ metabolismul acestuia. Utilizând un reactor cu amestecare totală s-a constatat că producţia de lipază depinde foarte mult de concentraţia de oxigen la valori scăzute ale acesteia. La reducerea concentraţiei de oxigen la valoarea de 47 μmoli/L se înregistrează nu numai o scădere bruscă a cantităţii de lipază, ci şi o modificare a metabolismului, substratul limitativ devenind oxigenul în locul carbonului (Giuseppin, 1984).

Influenţa fazei de dezvoltare a celulelor

Un alt factor important este relaţia dintre creşterea celulei şi formarea lipazei în timpul cultivării microorganismelor. Majoritatea cercetărilor au demonstrat că cea mai mare cantitate de lipază se produce în timpul fazei logaritmice de creştere, de exemplu în cazul microorganismelor *Acinetobacter* sp., *Rhizopus arrhizus*, *Pseudomonas fragi* şi *Pseudomonas aeruginosa* (Bloquel şi Veillet-Poncet, 1984).

Pentru culturile de *Acinetobacter calcoaceticus* activitatea lipazică a fost maximă în timpul fazei logaritmice, după 19 ore de incubare, ea scăzând drastic în timpul fazei staţionare, la doar 23% din valoarea precedentă după 24 de ore (Haferburg şi Kleber, 1982).

Unii cercetători au arătat însă că în anumite cazuri eliberarea lipazei în mediul de cultură începe la sfârşitul fazei logaritmice de creştere şi acumularea enzimei are loc în timpul fazei staţionare. Astfel în cazul culturilor de *Pseudomonas fluorescens*, activitate lipazică în mediu s-a detectat doar după 4-5 zile de incubare. *Chromobacterium viscosum* a produs lipază după 3 zile, iar *Staphylococcus aureus* după 4-5 zile (Bloquel şi Veillet-Poncet, 1984).

Condiţii de cultură pentru biosinteza industrială a lipazelor

Ţinând cont de potenţialele utilizării ale lipazelor în industrie drept catalizatori de transesterificare cât şi în detergenţi casnici, cercetătorii firmei Novo au iniţiat obţinerea unei lipaze la un cost mai redus decât cele accesibile pe piaţă în acest moment. Se pare că utilizarea unei tehnologii de ADN recombinat este foarte

importantă în realizarea acestui scop. S-a plecat de la *Rhizomucor miehei*, care secretă o lipază activă şi care a fost caracterizată anterior. Prin tehnici de inginerie genetică s-a reuşit folosirea de *Aspergillus oryzae* drept organism gazdă pentru sintetizarea, producerea şi secreţia în mediul de cultură a lipazei de *Rhizomucor miehei* recombinate (Huge-Jensen ş.a., 1989).

5.1.1.3. Purificarea şi caracterizarea lipazelor microbiene

Marea majoritate a enzimelor obţinute prin izolare din ţesuturi vegetale sau animale sau din culturi microbiene trebuie purificate până la eliminarea enzimelor care pot cataliza reacţii secundare nedorite. Aceasta poate sau nu să însemne purificare până la omogenitate.

În cazul enzimelor extracelulare, cum sunt majoritatea lipazelor microbiene, care sunt secretate în mediul de cultură, după terminarea fermentaţiei microorganismele se separă de mediu prin centrifugare sau filtrare. Soluţia rezultată poate fi uneori concentrată pentru a nu se manipula volume prea mari. Pentru aceasta se pot folosi membrane de ultrafiltrare (Brümmer şi Gunzer, 1987).

Următoarea etapă este separarea diferitelor tipuri de proteine prin precipitare fracţionată. Se ştie că distribuţia resturilor hidrofobe şi hidrofile la suprafaţa moleculei de proteină influenţează puternic solubilitatea ei în diferiţi solvenţi. Capacitatea de solvatare a diferitelor proteine de către apă poate fi modificată în sensul reducerii solubilităţii prin schimbări de pH, tărie ionică, adăugare de solvenţi organici miscibili cu apa, de alte substanţe dizolvate inerte sau polimeri, sau prin combinarea acestor metode, împreună cu modificarea temperaturii.

Principalele tehnici de purificare utilizate în cazul lipazelor sunt (Brümmer şi Gunzer, 1987).

- precipitarea selectivă cu ajutorul sărurilor neutre;
- precipitarea fracţionată cu ajutorul solvenţilor organici miscibili cu apa, cum ar fi etanolul sau acetona;
- gel-filtrarea sau cromatografia prin excluziune sterică;
- cromatografia de interacţiune hidrofobă;
- cromatografia de afinitate.

Există şi tehnici mai speciale de purificare a enzimelor cum ar fi cromatografia pe hidroxiapatită, focusarea izoelectrică, electroforeza preparativă şi cromatografia de lichide de înaltă performanţă preparativă. Acestea s-au dezvoltat în ultima perioadă, fiind tehnici de înaltă rezoluţie care permit o separare şi purificare foarte avansată a biomoleculelor.

O problemă foarte importantă care apare în cursul purificării enzimelor este pierderea de activitate. Enzimele sunt molecule proteice sensibile care dacă sunt scoase din mediul lor natural sunt supuse la o serie de factori perturbatori cărora adeseori nu sunt capabile să le reziste. Enzimele extracelulare reprezintă un caz fericit, întrucât ele sunt destinate din start să opereze într-un mediu mai ostil. De aceea şi purificarea lor se poate face cu şanse de reuşită mai mari.

Principalii factori care pot determina dezactivarea enzimelor în cursul operațiilor de purificare sunt (Brümmer şi Gunzer, 1987).

- denaturarea proteinei enzimatice, care poate avea loc sub influența temperaturii, pH-ului sau a solvenților organici. Din acest motiv purificarea trebuie făcută la o valoare de pH corespunzător aleasă (în general în domeniul 6-7) şi sub răcire, iar precipitarea cu solvenți organici trebuie făcută întotdeauna sub răcire, chiar la temperaturi sub 0°C.
- concentrația prea scăzută a proteinei, întrucât se cunoaşte că soluțiile diluate de enzime îşi pierd repede activitatea. Pentru a preveni această dezactivare este indicată fie concentrarea soluțiilor foarte diluate, fie adăugarea unei proteine inerte, cum este albumina (BSA).
- inactivarea centrului catalitic, care poate fi reversibilă sau ireversibilă. O cauză poate fi de exemplu oxidarea grupelor sulfhidril cu formare de punți disulfidice sau acizi sulfinici (-SOH, reversibil) sau sulfonici (-SOOH, ireversibil). Pentru a preveni această oxidare se recomandă adăugarea de ß-mercaptoetanol sau ditiotreitol.
- degradarea produsă de proteazele prezente în mediu. Acest lucru poate fi împiedicat prin introducerea în sistem a unor inhibitori ai proteazelor cum ar fi fenilmetil-sulfonil-fluorură sau pepstatină A.

Pentru stabilizarea soluțiilor enzimatice, în afară de sulfatul de amoniu pot fi utilizați şi alți compuşi cum ar fi glicerina, care are şi avantajul că permite conservarea la temperaturi sub 0°C, fără a îngheța. În locul glicerinei se pot folosi şi zaharide sau alcooli proveniți din reducerea acestora (glucoză, fructoză, lactoză, sorbitol).

Elaborarea unei scheme de purificare a unei enzime trebuie să țină cont de următoarele necesități:

- randament cât mai bun de recuperare a activității totale
- puritate cât mai ridicată a produsului
- reproductibilitatea procesului
- economicitatea utilizării reactivilor şi echipamentelor.

Pentru purificarea lipazelor microbiene au fost încercate o serie dintre metodele descrise anterior, cu scopul de a obține preparate enzimatice cu caracteristici reproductibile, care să fie susceptibile unei utilizări tehnologice sistematice.

O investigare calitativă a enzimelor prezente într-un preparat comercial tehnic de lipază din *Aspergillus niger*, conținând 55% proteină, a evidențiat alături de lipază prezența şi a următoarelor enzime: esterază, protează, amilază, endo-1,4-ß-glucanază, xilanază, pectinmetilesterază, poligalacturonază, catalază, ß-D-glucozidază şi ß-D-galactozidază (Höfelmann, 1985). Pentru purificare, soluția enzimei brute rezultată după ultrafiltrare s-a supus cromatografiei de schimb ionic pe DEAE-Trisacril M. Fracțiunile cu activitate lipazică s-au concentrat prin ultrafiltrare şi s-au purificat în continuare prin gel-filtrare pe Sephadex 650. În urma acesteia s-au obținut două izoenzime, notate lipază I şi lipază II, constatându-se dispariția activității glucozidazice şi galactozidazice. Eliminarea impurităților rămase s-a făcut prin cromatografie hidrofobă pe Phenylsepharose CL-4B şi recromatografiere pe același gel în condiții diferite. După această purificare s-a constatat, prin focusare izoelectrică, obținerea unor

lipaze omogene. Rezultatele acestor procedee de purificare sunt prezentate în tabelul 1.6, observându-se un factor de purificare final de 68 pentru lipaza I şi de 13 pentru lipaza II (Tabelul 5.2.).

Tabelul 5.2. Purificarea enzimei tehnice din *Aspergillus niger*.

Etapa de purificare	Volum (ml)	Proteine mg/ml	Proteine mg total	Activitate lipazică[a] U/ml	Activitate lipazică[a] U/mg prot.	Factor de purificare	Rand. (%)
Enzimă brută[b]	100	22,0	2200	108,0	4,9	1,0	100
Centrifugare-ultrafiltrare	40	30,0	1200	177,0	5,9	1,2	66
DEAE-Trisacril M	310	1,4	434	25,0	17,8	3,6	78
Ultrafiltrare	8	36,6	293	270,0	21,3	4,3	58
Sephadex G 50							
Lipază I	12	6,4	76,8	240,0	37,5	7,6	27
Lipază II	10	6,1	61,0	90,0	14,7	3,0	8
Phenyl-Sepharose CL-4B							
Lipază I, prima trecere	15	0,36	59,4	110,8	307,8	62,8	15
Cromatografie	4	0,39	42,1	129,4	331,7	67,7	5
Lipază II, prima trecere	15	0,65	9,8	32,0	49,2	10,0	5
Cromatografie	22	0,40	8,8	26,3	65,8	13,4	5

[a] Determinarea activităţii s-a făcut cu tributirină drept substrat, la 30°C şi pH 6,0.
[b] 4 g dizolvate în 100 ml soluţie tampon Tris/HCl, 0,06 M, pH = 7,0

Lipazele I şi II au puncte izoelectrice diferite, la 4,0 şi respectiv 3,5. Masele moleculare determinate prin gel-filtrare au fost 31000 şi respectiv 19000 daltoni, iar pH-ul optim s-a situat pentru ambele lipaze între 5 şi 6, ele rămânând însă active şi la pH între 7 şi 8.

Iwai şi Tsujisaka au studiat purificarea lipazei din *Rhizopus delemar*, constatând existenţa a trei izoenzime (Iwai şi Tsujisaka, 1974). Mediul de cultură s-a filtrat iar filtratul s-a adus la pH 4,5 cu HCl 1N şi s-a lăsat să stea timp de 30 de minute la 30°C. Pe urmă s-a centrifugat, denumindu-se enzima aflată în precipitat lipază B, iar celelalte două izoenzime, prezente în supernatant, lipază A şi respectiv C. Plecându-se de la filtratul culturii iniţiale cu activitatea de 3,3 U/mg proteină, după operaţiile de purificare s-au obţinut:

- lipaza A cu activitatea de 2,33 U/mg proteină cu un randament de regăsire a activităţii totale de 2 %;
- lipaza C cu activitatea de 1166 U/mg proteină cu un randament de regăsire a activităţii totale de 12 %;
- lipaza B cu activitatea de 4000 U/mg proteină cu un randament de regăsire a activităţii totale de 4,3%.

Toate trei izoenzimele din *Rhizopus delemar* au pH-ul optim la 5,6, temperatura optimă fiind în cazul lipazei A de 30°C iar în cazul lipazei B şi C de 35°C. S-a ajuns la concluzia că lipaza A reprezintă o proteină diferită de lipazele B şi C, având termostabilitate mai mare şi stabilitate la pH în limite mai largi.

Aisaka şi Terada au constatat că *Rhizopus japonicus* produce extracelular o cantitate mare de lipază şi lipoprotein-lipază (Aisaka şi Terada, 1981). Din filtratul mediului de cultură enzima brută s-a precipitat cu sulfat de amoniu până la 60% saturaţie şi s-a purificat după procedura următoare (toate operaţiile efectuându-se la o temperatură sub 5°C): precipitare cu etanol rece (-15°C) până la o concentraţie de 80%, cromatografie pe coloană mai întâi pe Column-lite, apoi pe Heparin-Sephadex 4B şi în sfârşit focusare izoelectrică. S-au obţinut două fracţiuni de lipază, factorul de purificare fiind de aproximativ 60, iar randamentul total de regăsire a activităţii enzimatice (în ambele fracţiuni) de 24 %. Masa moleculară a ambelor izoenzime s-a determinat a fi 42000, iar activitatea lor maximă s-a înregistrat la 35-40°C şi un pH între 7,0-8,5.

Tsujisaka ş.a. au purificat lipaza din *Geothricum candidum* până la o formă cristalizată (Tsujisaka, Iwai şi Tominaga, 1973). Filtratul culturii s-a fracţionat cu sulfat de amoniu (de la 25% la 75% saturaţie), precipitatul s-a dizolvat în apă deionizată şi s-a desalefiat pe o coloană cu Sephadex G-25, iar soluţia rezultată s-a purificat prin cromatografie pe o coloană cu DEAE Sephadex, eluându-se cu un gradient liniar de NaCl. Fracţiunea cu activitate lipazică s-a concentrat şi s-a trecut peste o coloană cu Sephadex G-100. Fracţiunile active s-au dializat faţă de apă şi s-au liofilizat. Pulberea liofilizată s-a dizolvat în soluţie tampon acetat 0,01 M de pH 5,0 şi s-a trecut peste o coloană cu Sephadex G-200. S-a obţinut un singur pic de activitate. Fracţiunile cu activitate mai mare de 1000 unităţi/mL s-au reunit şi s-au dializat faţă de apă distilată. În continuare, soluţia obţinută s-a concentrat sub presiune redusă. Cristalele au apărut când concentraţia proteinei a ajuns în jur de 10%. Cristalizarea s-a completat lăsând să stea soluţia la 8°C sub presiune scăzută timp de 3 zile. Enzima cristalizată s-a separat prin centrifugare şi s-a recristalizat prin dizolvare în soluţie NaOH 0,1 N la pH 8,8, aducerea pH-ului la 6,0 cu CH_3COOH, eliminarea substanţelor insolubile prin centrifugare, dializă faţă de apă şi cristalizare în aceeaşi manieră ca anterior. S-a obţinut o creştere de 40 de ori a activităţii faţă de soluţia iniţială şi un randament de regăsire a activităţii de 20% faţă de cea iniţială. Prin electroforeză s-a determinat că enzima este omogenă. Masa moleculară s-a determinat a fi între 53000-55000, punctul izoelectric la pH 4,3, domeniul optim de pH între 5,6 şi 7,0, iar temperatura optimă în jur de 40°C.

Cercetări de inginerie genetică efectuate ulterior de acelaşi colectiv au dus la concluzia că lipaza izolată din *Geothricum candidum* conţine de fapt două izoenzime (Sugihara, Schimada şi Tominaga, 1990). Pentru a le separa s-a purificat mai departe enzima obţinută anterior, prin cromatografie de interacţiune hidrofobă. După eluarea cu un gradient descrescător de la 25% la 0% saturaţie de sulfat de amoniu, s-au obţinut cele două izoenzime. Prima fracţiune, lipaza I, se obţine în cantitate de 8 ori mai mare decât cea de-a doua, lipaza II. Ambele au aproape aceeaşi activitate, acelaşi punct izoelectric şi temperatură optimă, dar diferă puţin masa moleculară (64000, respectiv

66000), pH-ul optim (8,0 şi respectiv 6,0) şi stabilitatea termică, lipaza I fiind mai stabilă. De asemenea s-a stabilit că secvenţele de aminoacizi terminali sunt diferite, existând deci diferenţe atât în ce priveşte structura primară, cât şi cea terţiară a celor două izoenzime. Ulterior s-a stabilit că ambele lipaze sunt constituite din 544 resturi de aminoacizi, din care 457 (deci 84%) sunt identice (Shimada ş.a, 1990).

Un preparat comercial brut de lipază din *Geothricum candidum* a fost purificat de Baillargeon prin cromatografie de interacţiune hidrofobă pe Octyl Sepharose (Baillargeon, 1990). După această operaţie s-au obţinut două picuri de activitate, corespunzătoare la două lipaze, în concordanţă cu cele arătate anterior. În continuare, s-a utilizat tehnica cromatofocusării pentru a separa eventualele componente ale celor două lipaze. S-a găsit că prima lipază conţine 5 izoenzime, iar cea de-a doua 4. Numărul izoenzimelor s-a redus la două după eliminarea hidraţilor de carbon. Se pare că aceste două izoenzime sunt proteine diferite, provenind din gene diferite.

Lipaza din *Penicillium cyclopium* a fost purificată prin precipitare cu sulfat de amoniu până la saturaţie de 75%, desalefiere pe o coloană cu Sephadex G-25 şi cromatografie de schimb ionic pe o coloană cu DEAE Sephadex A-50, obţinând două picuri de activitate, corespunzătoare la două izoenzime. Cea de-a doua enzimă, mult mai activă, s-a purificat prin ultrafiltrare, gel-filtrare pe o coloană cu Sephadex G-75 şi focusare izoelectrică, obţinând o enzimă omogenă. Rezultatele purificării indică o creştere a activităţii specifice de 54 de ori şi un randament de recuperare a activităţii enzimatice totale de 15,4%. Această lipază s-a dovedit a fi o glicerid-hidrolază parţială, fiind nespecifică în raport cu poziţia grupării esterice a gliceridei. De asemenea hidrolizează esteri metilici ai acizilor graşi cu catenă medie, însă vitezele acestor reacţii sunt foarte mici. Temperatura optimă pentru activitatea enzimei este 40°C, iar pH-ul optim 6,0 (Okumura, Iwai şi Tsujisaka, 1980).

Dintre lipazele obţinute din culturi de drojdii, cele mai importante sunt cele din genul *Candida*. Studiind un preparat comercial de lipază din *Candida cylindracea*, Brahimi-Horn ş.a. au constatat că el conţine mai multe esteraze, având încărcare ionică şi hidrofobicitate puţin diferită (Brahimi-Horn ş.a, 1990). Pentru purificare, preparatul brut de lipază s-a suspendat în soluţie tampon Tris/HCl 0,01 M, de pH 7,4, s-a dializat faţă de aceeaşi soluţie şi s-a purificat prin cromatografie de schimb ionic pe DEAE-cellulose. Eluarea s-a făcut cu un gradient liniar $0 \rightarrow 0{,}5$ M NaCl, apoi cu NaCl 1M. S-au obţinut două picuri de activitate, ambele prezentând atât activitate esterazică (faţă de p-nitrofenilacetat) cât şi lipazică (faţă de tributirină), raportul celor două activităţi fiind de două ori mai mare în primul pic. Electroforeza pe gel de poliacrilamidă a arătat că fiecare din aceste două fracţiuni are aceleaşi şase componente, în cantităţi diferite, ceea ce demonstrează că multiplicitatea esterazelor este o caracteristică a acestui preparat. În continuare, fracţiunile rezultate din cromatografia de schimb ionic s-au supus cromatografiei de interacţiune hidrofobă. S-au obţinut: un singur pic de activitate pentru prima fracţiune, respectiv trei picuri pentru cea de-a doua fracţiune. Aceste rezultate arată că preparatele comerciale reprezintă de fapt un amestec de enzime cu specificităţi de substrat diferite.

De altfel, în preparatul comercial de *Candida cylindracea* s-a pus în evidență și o esterază (E.C. 3.1.1.50.), specifică pentru ceruri (Brahimi-Horn, Guglielmino și Sparrow, 1989). Adoga și Mattey au constatat că în culturi de *Candida lipolytica*, utilizând sirop de porumb 2,5% ca sursă de carbon, se produce alături de lipază și o esterază extracelulară ce manifestă activitate maximă față de tributirină. Această enzimă se poate purifica prin precipitarea mediilor de cultură cu sulfat de amoniu la saturație de peste 40 %, urmată de fracționare prin gel-filtrare pe Sephadex G-100. Ea are o masă moleculară medie de 5000, temperatură optimă de 28-30°C și un pH optim foarte scăzut, în jur de 1,0 (Adoga și Mattey, 1979).

Shaw ș.a. au determinat prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă într-un preparat comercial de *Candida rugosa* trei izoenzime ale lipazei, numite A, B și C (Shaw, Chang și Wang, 1989). Purificarea preparatului brut s-a făcut prin cromatografie de schimb ionic pe o coloană cu DEAE-Sepharose CL-6B, separându-se lipaza A de lipazele B și C care eluează împreună. Pentru lipazele A și C s-au determinat temperaturile optime (52°C, respectiv 37°C) și pH-ul optim (7,0, respectiv 5,0).

O altă drojdie producătoare de lipază este *Saccharomycopsis lipolytica*, dar majoritatea acestei lipaze este legată în peretele celulei și are proprietăți diferite față de lipaza produsă extracelular (Ota ș.a., 1982). Lipaza legată de celulă s-a solubilizat fără liza peretelui celular prin incubare timp de 2 ore la 30°C cu un mediu conținând 0,1% Emulgen 950, 0,6% KH_2PO_4, 0,2% K_2HPO_4 și 0,1% KCl (pH 6,2). După filtrarea celulelor, enzima s-a precipitat cu sulfat de amoniu până la saturație de 85%, s-a filtrat și s-a dializat față de soluție tampon acetat de pH 5,0. Soluția rezultată s-a trecut peste o coloană cu CM-Sepharose CL-6B, separându-se două izoenzime, lipaza I și lipaza II. Lipaza I, după dializă și ultrafiltrare s-a trecut peste o coloană cu Sephadex G-100, iar lipaza II, după dializă, s-a purificat prin trecere pe o coloană cu DEAE - Sepharose CL-6B, ultrafiltrare și gel-filtrare pe o coloană cu Sephadex G-100, de două ori. Factorul de purificare a fost 69 în cazul lipazei I și 58 în cazul lipazei II, iar randamentul de recuperare a activității a fost de 8% în total. Ambele lipaze s-au dovedit a fi omogene prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă. Masele moleculare determinate au fost 39000 și respectiv 44000.

Lipazele bacteriene se pot purifica utilizând aceleași tehnici. Astfel, lipaza-esteraza din *Lactobacillus casei* a fost purificată de 54 de ori prin cromatografie de schimb ionic și gel-filtrare. Activitatea maximă s-a înregistrat la 37°C și pH 7,2 (Lee și Lee, 1989).

Lipaza din *Pseudomonas fluorescens* s-a purificat prin ultrafiltrare, liofilizare și cromatografie de schimb ionic pe o coloană cu DEAE-cellulose, realizând un factor de purificare de 23,6 și un randament de recuperare a activității enzimatice de 12%. Se consideră că această lipază prezintă o deosebită stabilitate termică și chimică (Andersson, 1980).

Lipaza din *Acinetobacter* sp. s-a purificat prin precipitare cu sulfat de amoniu până la saturație de 50%, dializă față de apă distilată și gel-filtrare pe o coloană cu Sephadex G-200, obținându-se două picuri de activitate. Fracțiunea ce conține

majoritatea activității lipazice s-a purificat în continuare prin trecere peste o coloană cu DEAE-Sephadex, obținându-se un factor de purificare de 250, cu o recuperare a activității totale de numai 2,3 %. Temperatura optimă a enzimei a fost între 30-33°C, iar pH-ul optim s-a situat între 8,25 și 8,50. Trebuie menționat însă că stabilitatea termică a lipazei purificate este mai scăzută decât a celei inițiale (Breuil și Kushner, 1975).

Lipaza din *Staphylococcus aureus* s-a purificat din filtratul de cultură prin precipitare cu sulfat de amoniu până la 70 % saturație, dializă, cromatografie pe o coloană cu hidroxilapatită, ultrafiltrare, gel-filtrare pe Sephadex G-200 superfin și gel-filtrare pe Sephadex G-150 superfin. S-a obținut o singură fracțiune de lipază, cu un factor de purificare de 385 și un randament de recuperare a activității totale de 25% în raport cu filtratul culturii inițiale. Masa moleculară, determinată prin gel-filtrare, este 34000, punctul izoelectric la pH 9,7, iar temperatura optimă s-a determinat a fi 60°C pentru hidroliza trioleinei. Lipaza obținută nu prezintă specificitate pentru pozițiile 1 și 3 ale trigliceridelor, hidrolizând tot așa de bine și 2-monooleina (Muraoka, Ando și Okuda, 1982).

Lipaza intracelulară din *Streptococcus thermophilus* a fost eliberată prin acțiunea presiunii asupra celulelor congelate, urmată de fracționare prin centrifugare la 48.000 g timp de 10 minute. Temperatura și pH-ul optim ale acestei enzime sunt 45°C, respectiv 9,0. S-a demonstrat că activitatea ei este mai mare față de tributirină decât față de trigliceridele cu catenă lungă ca uleiul de măsline, uleiul de soia sau uleiul din germeni de porumb (DeMoraes și Chandan, 1982).

Din datele care au fost prezentate se poate trage concluzia că lipazele microbiene pot fi purificate până la omogenitate, utilizând tehnici de precipitare fracționată și cromatografice. Dintre procedeele cromatografice cele mai utilizate sunt cromatografia pe gel, cromatografia de schimb ionic și cromatografia de interacțiune hidrofobă, în general fiind preferată o combinare a acestora pentru a realiza purificări avansate. În acest mod s-au obținut grade de purificare de la câteva zeci la câteva sute, dar trebuie menționat că nu se poate evita denaturarea unei părți din enzimă, ceea ce se reflectă prin randamente de regăsire a activității enzimatice totale în general sub 10%. Majoritatea preparatelor enzimatice comerciale de origine microbiană sunt de proveniență fungică, de aceea și metodele de purificare sunt mai bine puse la punct în cazul acestora.

5.1.2. Obținerea, purificarea și caracterizarea lipazelor pancreatice

Cu toate că o serie de organe și țesuturi animale conțin lipaze, importanța cea mai mare o prezintă lipazele pancreatice. Cea mai studiată este lipaza din pancreas de porc, atât datorită concentrației sale ridicate (2,5% din totalul proteinelor prezente în sucul pancreatic), cât și randamentului bun cu care poate fi izolată (Shahani, 1975).

Conținutul în lipază pancreatică pentru diferite specii de animale, prezentat în Tabelul 5.3, arată diferențe de până la 10 ori în ce privește activitatea (exprimată în

μmoli acid gras eliberat într-un minut) raportată la 1 g pancreas proaspăt (Verger, 1984).

Tabelul 5.3. Conținutul de lipază pancreatică în glandele pancreatice ale diferitelor specii de animale.

Specia	Activitatea lipazică (U/ g pancreas proaspăt)
Porc	13000
Pui	9000
Iepure	4700
Cal	4300
Bou	2800
Oaie	1750

Este evident că cea mai avantajoasă metodă pentru obținerea de lipază pancreatică este izolarea și purificarea ei din pancreas de porc. Trebuie arătat că pancreasul conține și alte enzime, cum ar fi: monoglicerid-lipază, carboxilesterază, colesterol-esterază, care de asemenea catalizează hidroliza di- și trigliceridelor, dar sunt diferite de triglicerid-lipaza care ne interesează. Ele sunt în general mai puțin specifice în privința esterilor primari în raport cu cei secundari, au randamente scăzute de recuperare și utilizează de preferință substraturi solubile (Brockmann, 1981). S-a constatat că într-un preparat proaspăt de pancreas, obținut prin extracția pancreasului măcinat cu soluție tampon Tris/HCl 0,05 M de pH 8,0 și centrifugare, activitatea lipazică a fost de 2,7 ori mai mare decât cea esterazică (Bezáková și Kovács, 1981).

Procedeul inițial pentru izolarea, purificarea și caracterizarea lipazei din pancreas de porc, elaborat de Desnuelle ș.a. în 1957, cuprindea obținerea unei pudre acetonice, precipitarea fracționată cu sulfat de amoniu, acetonă și alcool și electroforeză pe gel de amidon. Această tehnologie a fost modificată în cursul anilor, ajungându-se la o variantă finală ce cuprinde ca primă etapă o degresare avansată a pancreasului prin extracție cu solvenți (Verger, 1984). Rezultatele cele mai bune s-au obținut prin degresarea pancreasului înainte de extracția cu apă a lipazei. Această etapă trebuie făcută cu multă atenție, pentru a obține probe de lipază reproductibile. Au fost detectate lipide mai strâns legate, care rămân asociate cu lipaza în timpul purificării din pancreasul omogenizat. Este recomandabil a se controla conținutul total de lipide rămase, care se pot extrage cu amestec $CHCl_3$/MeOH (2:1 în volume). Trebuie reamintit că pulberea acetonică pancreatică nu este lipsită de grăsimi, deoarece acetona singură nu este un solvent universal pentru lipide.

Extractele apoase de lipază, obținute în continuare și conținând 1 mM diizopropilfluorofosfat (DFP) s-au fracționat cu sulfat de amoniu, îndepărtându-se un fosfolipid cu caracter acid prin repartiție între n-butanol și sulfatul de amoniu. Apoi urmează cromatografia pe DEAE-celuloză (la pH 8,0), gel-filtrare pe o coloană cu Sephadex G-100 și o separare a izoenzimelor lipazei prin cromatografie pe CM-

cellulose, eluarea făcându-se cu un gradient de pH între 5,0 şi 5,3. Utilizarea unor inhibitori ai serin-proteinazelor cum ar fi DFP sau benzamidină şi fenil-metil-sulfonil-fluorură în cursul tuturor acestor etape de purificare, pentru a preveni proteoliza lipazei, este esenţială. Aceeaşi metodă, fără prima etapă de degresare, este aplicabilă şi pentru obţinerea lipazei din sucul pancreatic.

Conform unui brevet german (Müller, 1977) lipaza pancreatică se poate obţine prin autoliza şi degresarea simultană a ţesutului pancreatic tocat, utilizând un amestec de solvenţi. Astfel, 100 kg pancreas congelat s-au tocat şi apoi s-au tratat cu 75 L toluen şi 25 L butanol timp de 4 ore la 15°C. Resturile de ţesuturi s-au eliminat prin centrifugare, iar soluţia albă lăptoasă de supernatant s-a precipitat cu acetonă. Precipitatul s-a uscat, obţinându-se un randament de 10%, raportat la pancreas. Într-o altă variantă a procedeului, amestecul de solvenţi a fost constituit din 75 L toluen sau hexan, 15 L acetonă şi 20 L butanol, obţinându-se de data aceasta un randament de 11,8%, dar o activitate puţin mai mică.

O reţetă pentru obţinerea lipazei din pancreas de porc a fost elaborată de Meyer ş.a. 5 kg de glande pancreatice de porc se răcesc la 0°C în cel mult 4-6 ore de la sacrificarea animalului. Menţinându-se la această temperatură, glandele se curăţă de ţesuturile grase şi conjunctive şi se macină de câteva ori până se obţine o pastă destul de fluidă (cca. 2,5 l). Aceasta se agită timp de 4-6 ore cu 2,5 L acetonă şi apoi se centrifughează. Reziduul se extrage de încă 3 ori cu acelaşi volum de acetonă, de 2 ori cu amestec acetonă-eter etilic 1:1 şi de două ori cu eter. Produsul se usucă timp de 48 de ore în vid, obţinând o pudră. Se poate obţine un preparat solubil, dacă se tratează această pudră cu o soluţie de glicerină 87%. Atât pudra cât şi soluţia în glicerină sunt la fel de stabile ca activitate (Bier, 1955).

Pentru purificarea lipazei pancreatice se propune următoarea succesiune de etape:

- 60 g pulbere pancreatică se extrag timp de 36 de ore la 4°C cu 840 mL soluţie $MgSO_4$ 0,1 M, la care se adaugă 1 mL toluen şi 2 picături alcool decilic. Materialul insolubil se elimină prin centrifugare, iar supernatantul se aduce la pH 4,5 cu HCl 0,1 N.

- la soluţia rece se adaugă 1 l amestec apă-acetonă (60 % în volume) răcit în prealabil la -20°C. Se agită 20 de minute, se centrifughează şi se îndepărtează supernatantul. Nu se poate preveni din păcate pierderea a 28% din activitate în această etapă.

- precipitatul se amestecă, încet, cu 730 mL apă distilată răcită la 0°C, se agită 10 minute şi apoi se centrifughează. Supernatantul se aruncă.

- precipitatul se tratează cu 40 mL soluţie $MgSO_4$ 0,5 M apoi cu 320 mL apă cu gheaţă şi 12 mL acid acetic 0,2 M. Se agită 10 minute şi se centrifughează. Enzima se află în supernatant, căreia i se adaugă un volum egal de apă distilată, iar materialul care precipită se elimină din nou prin centrifugare.

- supernatantului i se adaugă 1,4 L apă cu gheaţă conţinând 12 mL acid acetic 0,2 M şi se agită 15 minute. Puţinul precipitat care se formează se izolează prin

centrifugare. El conține 21,5% din activitatea extractului brut, iar factorul de purificare este 17,2.

Tehnologia purificării a fost îmbunătățită de Verger ş.a., conform unei proceduri ce conține următoarele trei etape: obținerea pancreasului degresat, extracția lipazei şi purificarea prin afinitate utilizând granule de sticlă hidrofobă şi cromatografie pe DEAE-Cellulose (Brockmann, 1981). Rezultatele acestei purificări sunt prezentate în Tabelul 5.4.

Tabelul 5.4. Purificarea lipazei din pancreas de porc

Procedeul de purificare	Volum mL)	Activitate totală[a] (U x 10^{-4})	Proteine totale (mg)	Activitate specifică (U/mg)	Rand. (%)
Extracția pancreasului degresat	190 ± 7	96 ± 13	(1,1 ± 0,1)x10^{-4}	87	100
Concentrarea eluatului de pe granulele de sticlă	107±16	35 ± 14	220 ± 90	1590	36
Cromatografia pe DEAE-celuloză					
Fracțiunea I	189	21,1	33,0	6360	7,3
Fracțiunea II	170	9,7	17,1	5610	3,3
Fracțiunea III	224	12,4	24,0	5120	4,3

[a] O unitate de activitate (U) înseamnă 1 μmol acid butiric eliberat într-un minut

Fracțiunea I obținută în urma cromatografiei pe DEAE-cellulose s-a dovedit a fi omogenă în cromatografia pe gel de poliacrilamidă şi identică cu izoenzima cunoscută sub numele de lipază B, având mai puțin de 2% colipază. Reprezintă 40% din lipaza purificată obținută. Fracțiunea III conține două izoenzime, lipazele A şi B în amestec cu aproximativ 50% colipază. Fracțiunea II conține de asemenea o cantitate apreciabilă de colipază. Dacă se consideră necesar, ele pot fi purificate în continuare pentru eliminarea colipazei, dar trebuie menționat că contaminarea cu colipază este caracteristică pentru majoritatea lipazelor pancreatice purificate.

Contaminarea cu colipază se poate determina prin aducerea pH-ului la 2,0 sau prin încălzire la 70°C timp de 30 minute, condiții în care lipaza se dezactivează, în timp ce colipaza este stabilă. După aceasta se ia câte o probă din aceste preparate şi se determină influența lor asupra activității lipazei pure. Întrucât există o diferență a activității lipazei în prezența sărurilor acizilor biliari în absența colipazei (activitate directă) şi în prezența unui exces de colipază adăugată (activitate potențială), se poate estima colipaza prezentă în preparatul de bază. Este probabil că prezența unor cantități variabile de colipază în probele de lipază este legată de eficiența primei etape de degresare. Acest lucru este demonstrat de faptul că dacă obținerea lipazei s-a făcut din sucul pancreatic lipsit de lipide, nu s-a observat contaminarea cu colipază.

Lipaza formează cu colipaza un complex în raport molar de 1:1. Constanta de disociere a legăturii, care este atât electrostatică cât şi hidrofobă, este de $5x10^{-7}$ M în soluţie tampon. În soluţie de săruri ale acizilor biliari, această legătură este mai slabă însă în prezenţă de acid oleic devine de aproape 100 de ori mai puternică, acelaşi efect avându-l şi alte lipide, ceea ce explică dificultatea separării lipazei de colipază în prezenţa lipidelor. S-a demonstrat că în prezenţa colipazei în lipază are loc o modificare de conformaţie (Erlanson-Albertsson şi Akerlund, 1982).

Colipaza are un rol esenţial în digestia grăsimilor din organism. Se ştie că lipaza pancreatică hidrolizează grăsimile la interfaţa lipid-apă a miceliilor. Adsorbţia lipazei la această interfaţă este inhibată de sărurile acizilor biliari. Colipaza elimină efectul inhibitor servind ca o "ancoră" pentru lipază la această interfaţă (Müller, 1984).

S-a mai propus şi o altă metodă de purificare a lipazei din pancreas de porc, prin cromatografie de afinitate utilizând un derivat de acid fenilboronic. Procedeul poate fi utilizat în diferite etape ale purificării. S-a determinat o creştere a activităţii specifice de 20 de ori (Verger, 1984).

5.1.3. Structura lipazei şi conformaţia centrului activ

Cele mai multe studii referitoare la structura şi mecanismul de acţiune au fost efectuate asupra lipazei pancreatice. S-a stabilit că ea este constituită din două izoenzime, lipaza A şi lipaza B care diferă doar prin faptul că lipaza A este mai acidă. În stare normală, aşa cum s-a arătat, aceste două enzime sunt asociate cu câte o coenzimă. Aceste coenzime sunt constituite din catene polipeptidice aproape similare, având masa moleculară în jur de 11000 (Worthington, 1975).

Masa moleculară a lipazei din pancreas de porc a fost estimată la 45000-50000 (Verger ş.a., 1969). A fost determinată structura primară completă a lipazei pancreatice, stabilindu-se că ea este formată dintr-un singur lanţ de 449 aminoacizi (De Caro ş.a., 1981) Această secvenţă corespunde unei mase moleculare a enzimei de 49.859, la care se adaugă un rest de hidraţi de carbon (restul de glucan) cu masa moleculară în jur de 2000, cea ce dă o masă moleculară totală în jur de 52.000. Au fost determinate structurile primare şi pentru o serie de lipaze de origine bacteriană sau fungică (Svendsen, 2000).

În ce priveşte succesiunea aminoacizilor în secvenţa primară a lipazei pancreatice, două aspecte trebuie menţionate: regiunea (206-217) în care succesiunea a 11 aminoacizi hidrofobi este întreruptă de un singur rest de asparagină şi regiunea (336-349) în care există o alternare regulată a aminoacizilor polari şi nepolari (Verger, 1984).

Lipaza pancreatică conţine 14 resturi de cistină, a căror distribuţie este neuniformă. Ele formează şase punţi disulfidice prin legături S-S, rămânând două grupări SH libere.

Dintre acestea, prima grupare SH_1 a fost localizată pe Cys-181 şi se consideră că rolul ei nu este important pentru activitatea lipazei. Pentru cea de-a doua grupă

tiolică SH_{II} s-a sugerat existența a doi izomeri, SH_{II} fiind fie pe Cys-101 fie pe Cys-103. Rolul acestei grupe în activitatea catalitică a lipazei nu este încă elucidat.

Reprezentarea schematică a lanțului polipeptidic al lipazei pancreatice, cu localizarea grupărilor sulfhidril și a punților disulfidice este dată în Figura 5.1. (Benkouka ș.a, 1982).

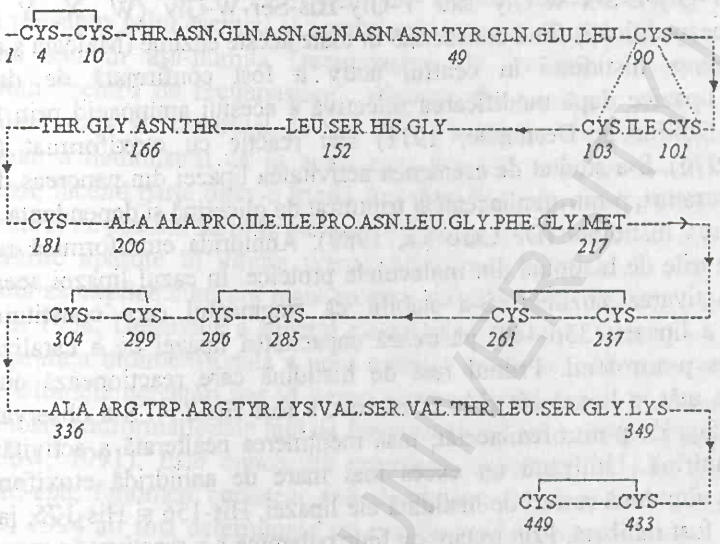


Figura 5.1. Structura primară a lipazei pancreatice

Referitor la structura secundară a lipazei pancreatice, s-a presupus o structură α-helicoidală doar pentru 5% din lanțul peptidic, lucru confirmat de datele de dicroism circular. Energia de formare a structurilor secundare s-a interpretat ca fiind legată de posibilitatea de existență a două domenii separate al căror punct de demarcație este situat între resturile de aminoacizi 240-320 (Benkouka ș.a, 1982).

Răspunsul final la problemele de structură a lipazei îl vor da probabil studiile de raze X (Verger, 1984). Structura terțiară a lipazei cristalizate din *Geothricum candidum* a fost determinată printr-o asemenea metodă. S-a stabilit că molecula enzimei are o formă elipsoidală, cu dimensiunile 50x50x70 Å și posedă o deschizătură largă în dreptul centrului moleculei, unde se presupune că ar fi localizat centrul activ (Hata ș.a., 1979).

În ce privește structura centrului catalitic activ al lipazei și a resturilor de aminoacizi implicate în activitatea catalitică, la început nu s-au putut face decât supoziții. S-a presupus că lipaza este enzimă de tip serină-histidină ca multe alte esteraze și proteinaze cum ar fi chimotripsina sau elastaza. Lipaza pancreatică nu este inhibată de diizopropilfluorofosfat (DEP), inhibitorul standard al esterazelor care au serina drept aminoacid reactiv în centrul activ, însă este inhibată de dietil-p-nitrofenil-fosfat (DNP) (Brockerhoff, 1974). Așa cum s-a demonstrat ulterior, DEP reacționează

cu tirozina neesențială Tyr-49, în timp ce DNP reacționează cu serina esențială Ser-152, aceeaşi care probabil participă la fixarea la interfață a lipazei în secvența His-Ser-Leu-Gly (151-154) (De Caro ş.a., 1981).

În ultimii 20 de ani însă s-au făcut paşi importanți în direcția elucidării compoziției centrului activ al lipazelor. S-a stabilit că toate lipazele a căror structură primară a fost determinată posedă secvențe omoloage, dintre care una semnificativă de tip **His**-X-Y-Gly-Z-**Ser**-W-Gly sau Y-Gly-**His**-**Ser**-W-Gly (W, X, Y şi Z fiind aminoacizi nespecificați) fiind conservată în toate aceste enzime (Malcata ş.a, 1992).

Prezența histidinei în centrul activ a fost confirmată de determinările activităților lipazice după modificarea selectivă a acestui aminoacid prin fotooxidare (Semeriva, Dufour şi Desnuelle, 1971) sau reacție cu etoxiformiat (Chapus şi Semeriva, 1976). S-a studiat de asemenea activitatea lipazei din pancreas de porc față de două substraturi, p-nitrofenilacetat şi tributirat de glicerină şi dependența acestora de etoxiformilarea histidinei (De Caro ş.a, 1989). Anhidrida etoxiformică reacționează rapid cu resturile de histidină din moleculele proteice. În cazul lipazei această reacție duce la inactivarea enzimei. S-a stabilit că fragmentul care constituie secvența C-terminală a lipazei (336-449) păstrează capacitatea lipazei de a cataliza hidroliza acetatului de p-nitrofenil. Primul rest de histidină care reacționează cu anhidrida etoxiformică, atât în lipază cât şi în acest rest, a fost His-354. S-a observat dispariția activităților față de p-nitrofenilacetat, însă menținerea nealterată a activității enzimei față de tributirină. Utilizând un exces mai mare de anhidridă etoxiformică, s-au etoxiformilat alte două resturi de histidină ale lipazei, His-156 şi His-175, iar hidroliza tributirinei a fost inhibată. Prin tratare cu hidroxilamină s-a reactivat în mare parte atât lipaza cât şi fragmentul de lipază. Prin aceste rezultate s-a demonstrat că cele două activități nu sunt asociate aceluiaşi centru activ, deci lipaza pancreatică are doi centri activi: unul pentru hidroliza trigliceridelor şi unul pentru hidroliza p-nitrofenilacetatului.

Mecanismele asociate acestor două tipuri de cataliză s-au presupus a fi diferite: în cazul hidrolizei trigliceridelor lipaza împreună cu centrul ei activ posedă un domeniu topografic delimitat, reponsabil de interacția enzimei cu interfața lipid-apă. Această interacție este urmată de activarea enzimei. În cazul acțiunii lipazei asupra p-nitrofenil-acetatului, acțiunea este mult mai simplă, însă activitatea enzimei mult mai mică (6%, raportată la hidroliza tributirinei). În ce priveşte rolul restului Ser-152, s-a considerat că sunt necesare investigații suplimentare.

Referitor la inhibarea activității de hidroliză a tributirinei se pot formula două ipoteze (De Caro ş.a, 1989).

1. His-156 şi/sau His-75 fac parte din centrul activ şi acilarea duce la împiedicarea funcționării lor (lui) in acest sens.

2. Etoxiformilarea determină modificări conformaționale în arhitectura moleculară, care nu sunt favorabile formării centrului activ.

O altă confirmare a prezenței histidinei în centrul activ este faptul că valorile pK pentru resturile de aminoacizi responsabile pentru actul catalitic au fost raportate de

mai mulţi autori ca fiind într-un domeniu specific histidinei (Momsen şi Brockman, 1976; Lagocki, Law şi Kézdy, 1973)

În ce priveşte prezenţa serinei în centrul activ, aceasta a fost confirmată de influenţa asupra activităţii lipazei a derivatizării cu dietil-p-nitrofenilfosfat (Maylie ş.a., 1969) sau utilizării unor inhibitori specifici pentru serină. Plecându-se de la pierderea activităţii enzimatice prin modificarea chimică a restului Ser-152 a lipazei din pancreas de porc, s-a presupus rolul esenţial al acestui rest în cataliză, dar alţi autori au acreditat ideea rolului său în aşa-numita "recunoaştere la interfaţă", avansându-se ideea existenţei unui "centru de recunoaştere", distinct din punct de vedere topologic de centrul catalitic activ şi controlat de Ser-152. Un studiu efectuat asupra lipazei din pancreas uman a demonstrat că în acest caz, Ser-152 este restul nucleofil esenţial pentru cataliză, făcând parte dintr-o triadă Asp-Ser-His, care este analoagă chimic, dar diferită structural de cea din serin-proteinaze (Winkler, D'Arcy şi Hunziker, 1990).

Lucrările apărute în ultima vreme referitoare la strucura tridimensională a lipazelor caută să explice cum pot nişte enzime solubile să acţioneze la suprafaţa unor lipide. Încă în 1958, Desnuelle a sugerat că acţiunea lipazelor trebuie considerată mai curând în suprafaţa bidimensională a unui miceliu decât în volumul tridimensional al unei soluţii. Ultimele cercetări par să demonstreze această viziune, susţinând varianta acestei schimbări conformaţionale faţă de forma solubilă, atunci când lipaza se leagă de interfaţă (Blow, 1991). Este cunoscută creşterea importantă a activităţii lipazei la interfaţa lipid-apă, fenomen cunoscut sub denumirea de "activare la interfaţă". Din fericire, după 1994 au fost determinate structurile tridimensionale pentru mai mult de 10 tipuri de lipaze, prin studii de raze X (Anthonsen ş.a., 1995). Pe baza unui asemenea studiu efectuat asupra lipazei din pancreas uman şi a celei microbiene din *Rhizomucor miehei* s-a determinat că în ambele enzime centrii activi conţin triade Asp-Ser-His cu structură omoloagă, care sunt complet ecranate datorită unui scurt segment elicoidal. Autorii presupun că în momentul activării la interfaţă are loc deplasarea acestui "capac" elicoidal şi centrul activ al enzimei este dezecranat (Brzozowski ş.a., 1991). Atunci când lipaza acţionează într-un solvent organic, de exemplu etanol sau 2-(2-etoxietoxi)-etanol conţinând trioleină, nu se observă acestă activare la interfaţă chiar dacă concentraţia trioleinei creşte peste limita sa de solubilitate în mediul respectiv, deci are loc formarea interfeţei. Acest fapt s-a explicat prin faptul că în solvenţi organici nu are loc adsorbţia enzimei la interfaţă, probabil datorită absenţei efectului hidrofob care este forţa motrice a adsobţiei lipazei din soluţii apoase la interfeţe hidrofobe. Absenţa adsorbţiei la interfaţă şi a activării la interfaţă sugerează faptul că acel "capac"elicoidal rămâne închis, determinând reducerea activităţii în mediile organice (Louvrier, Drtina şi Klibanov, 1996).

În ce priveşte structura cuaternară a lipazelor, există date experimentale ce demonstrează că unele lipaze pot fi constituite din două (Isobe şi Sugiura, 1977), patru (Twu, Garfinkel şi Schotz, 1984) şi chiar şase (Tyski, Hryniewicz şi Jeljaszewicz, 1983) subunităţi. De asemenea, unele lipaze pot fi asociate cu resturi glicozidice ca în cazul lipazei pancreatice (De Caro ş.a., 1981), sau cu resturi lipidice (Fielding, Shore şi Fielding, 1974).

5.1.4. Specificitatea lipazelor

Există cinci tipuri de specificitate a lipazelor (Jensen, Galuzzo şi Bush, 1990):
- specificitate în funcţie de clasele de lipide;
- specificitate de poziţie;
- specificitate în funcţie de natura acidului gras;
- stereospecificitate;
- specificitate combinată a celor menţionate.

Primul tip este mai puţin răspândit, existând totuşi anumite lipaze care manifestă selectivitate faţă de o anumită clasă de gliceride, de exemplu o lipază din *Penicillium cyclopium* faţă de monogliceride (Okumura, Iwai şi Tsujisaka, 1980).

În privinţa specificităţii de poziţie, lipazele obţinute din surse naturale pot fi nespecifice sau pot manifesta specificitate faţă de poziţiile 1,3 respectiv 2 ale trigliceridelor. Cele nespecifice hidrolizează în mod egal toate cele trei legături esterice, exemple din acestă categorie fiind lipazele din *Chromobacterium viscosum* (Sugiura şi Isobe, 1975), *Pseudomonas fluorescens* (Sugiura ş.a., 1977) *Candida cylindracea* (Benzonana şi Esposito, 1971), *Geothricum candidum* (Okumura, Iwai şi Tsujisaka, 1976) şi *Penicillium cyclopium* (Tsujisaka, Okumura şi Iwai, 1977). În schimb, s-a demonstrat că lipaza pancreatică manifestă o specificitate de poziţie, hidrolizând preferenţial legăturile esterice din poziţiile 1 şi 3 ale trigliceridelor. Secvenţa de reacţie a hidrolizei trigliceridelor este cea redată în Figura 5.2.

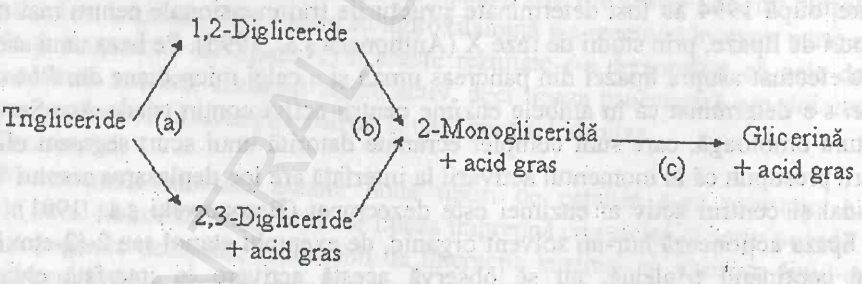


Figura 5.2. Secvenţa reacţiei pentru hidroliza trigliceridelor, catalizată de lipaza pancreatică

Reacţia (a) este foarte rapidă, (b) are loc cu viteză scăzută, iar (c) foarte scăzută. Faptul că hidrolizatele de gliceride conţin şi 1-monogliceride, trebuie atribuit izomerizării 2-monogliceridelor respective în timpul lipolizei. Alte lipaze care manifestă 1,3-specificitate sunt cele provenite din *Rhizopus arrhizus* (Benzonana, 1974), *Aspergillus niger* (Okumura, Iwai şi Tsujisaka, 1976), *Rhizopus delemar* (Tsujisaka, Okumura şi Iwai, 1977) şi *Mucor miehei* (Sonnet, 1988). Specificitatea faţă de poziţia 2 a trigliceridelor este întâlnită extrem de rar.

O serie de lipaze au proprietatea de a ataca preferenţial acele legături esterice în urma hidrolizei cărora sunt puşi în libertate acizi graşi cu o anumită lungime a

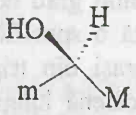
catenei hidrocarbonate sau cu un anumit grad de nesaturare. Este acceptat în general faptul că lipaza pancreatică manifestă o specificitate în funcție de lungimea catenei hidrocarbonate a esterilor acizilor grași din trigliceride. Cei cu catenă scurtă sunt hidrolizați mai repede decât cei cu catenă lungă, viteza maximă înregistrându-se în cazul tributirinei (Müller, 1977). Lipaza din *Mucor miehei* manifestă specificitate față de acizii grași C_4 și C_6 (Moskowitz ș.a., 1977). Datele experimentale au arătat că lipazele din *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* și *Rhizopus arrhizus* manifestă în reacțiile de esterificare o specificitate ce are formă de clopot, cu maximul de activitate centrat asupra alcoolilor cu catenă de 6, 4 și respectiv 2 atomi de carbon (Langrand ș.a., 1990). Putem avea și specificitate bimodală, atunci când există două zone de lungimi de catenă preferate de lipază, de exemplu pentru C_3-C_4 și C_8-C_{10} în cazul lipazelor din *Penicillium cyclopium* și *Rhizopus delemar* (Malcata ș.a, 1992). Ea se poate explica prin existența mai multor centri activi în molecula lipazei (Winkler, D'Arcy și Hunziker, 1990). În general însă trebuie menționat că acest tip de specificitate variază foarte mult în raport cu natura lipazei și tipul reacției catalizate, de aceea trebuie determinat pentru fiecare caz în parte.

La aceeași lungime a catenei hidrocarbonate, lipaza pancreatică și o serie de alte lipaze manifestă specificitate pentru esterii acizilor grași nesaturați, iar viteza cu care este atacat substratul pare să crească cu numărul de duble legături din catena hidrocarbonată (Malcata ș.a, 1992). Totuși unele studii mai complete au arătat că de fapt și aici avem o distribuție sub formă de clopot a vitezei de reacție asupra substratului în funcție de numărul de legături duble din catena hidrocarbonată (Sugiura și Isobe, 1975). După unele surse, există și lipaze cu specificitate numai pentru acizii grași C_{18} cu o dublă legătură în poziția cis-9, care deci vor duce la obținerea doar a acestor acizi în urma hidrolizei (Mukherjee, 1990). Prin imobilizare, specificitatea față de acizii grași se poate schimba, de exemplu lipaza din *Mucor miehei* imobilizată pe un schimbător de ioni de tip Duolite manifestă activitate de hidroliză mai mare în direcția acizilor saturați C_{14} și C_{16} decât enzima liberă (Huge-Jensen, Galuzzo și Jensen, 1987).

Proprietatea de enantiospecificitate a lipazelor nu a fost cunoscută multă vreme, însă la ora actuală există o literatură extrem de bogată referitoare la sinteze enantioselective catalizate de lipaze (Schoffers, Golebiowski și Johnson, 1996). Majoritatea acestora se referă la obținerea unor alcooli și esteri optic activi prin rezoluția unor substraturi racemice netrigliceridice. O parte dintre acestea vor fi menționate în capitolul referitor la aplicațiile reacțiilor catalizate de lipaze.

În multe reacții enantioselective catalizate de lipaze, s-a observat obținerea aceloraşi izomeri, ceea ce pe de o parte confirmă structura asemănătoare a lipazelor, iar pe de altă parte conduce la ideea că în unele situații se poate enunța o regulă care să prevadă enantiomerul ce se va obține.

Această regulă empirică se referă la alcoolii secundari și se bazează pe diferența de mărime a substituenților de la atomul de carbon secundar. Formularea regulii se face pe baza reprezentării schematice a orientării substituenților de la atomul de carbon menționat (Kazlauskas și Bornschauer, 1998).



Când gruparea hidroxilică este în afara planului hârtiei, enantiomerul care este ales de lipază şi care va reacţiona cel mai repede este acela care în dreapta grupării -OH are substituentul cel mai voluminos (*M*), respectiv în stânga grupării -OH substituentul mai puţin voluminos (*m*).

Gradul de enantioselectivitate variază pentru diferiţi alcooli şi enzime, însă toate lipazele testate au reacţionat conform regulii de mai sus.

5.2. Cinetica şi mecanismul reacţiilor catalizate de lipaze

Cinetica reacţiilor enzimatice a fost mult studiată şi există un mare număr de cărţi de specialiatate care se ocupă de aspectele generale legate de acest subiect (Roberts, 1977; Piszkiewicz, 1977, Engel, 1981, Cornish-Bowden, 1995). Acele reacţii enzimatice unde substratul este insolubil în apă reprezintă însă un caz particular, reacţia având loc într-un mediu eterogen. Astfel de reacţii sunt majoritatea reacţiilor catalizate de lipaze (excepţie reprezentând cele care au loc în mediu organic practic anhidru), întrucât s-a constatat că lipaza face parte dintre acele enzime care acţionează preferenţial asupra substraturilor emulsionate. Acest lucru face ca emulsifierea cât mai bună a substratului să fie esenţială pentru buna desfăşurare a lipolizei, motiv pentru care este indicată prezenţa în sistem a unui emulgator.

În general, viteza iniţială (v) a unei reacţii enzimatice creşte cu concentraţia substratului (S) până la o limită superioară (V_m). Curba care redă dependenţa $v = f(S)$, denumită curbă Michaelis, are forma unui arc de hiperbolă echilateră a cărei asimptotă este orizontală. Interpretarea acestui fenomen este că enzima (E) adsoarbe reversibil substratul pentru a da un aşa-zis complex enzimă-substrat ES*, iar produsul reacţiei (P) este eliberat pe măsura formării sale, odată cu regenerarea enzimei libere. Viteza de reacţie este deci proporţională cu numărul moleculelor complexului şi curba Michaelis poate fi asimilată cu o izotermă de adsorbţie.

$$E + S \rightleftharpoons ES^* \longrightarrow E + P$$

În cazul enzimelor care acţionează într-un mediu eterogen, cum ar fi lipaza, nu mai putem vorbi despre o concentraţie de substrat propriu-zisă, dar s-a constatat că viteza de hidroliză creşte cu cantitatea de fază emulsionată, tinzând spre o valoare limită. S-a demonstrat că prima etapă a catalizei este şi de această dată o adsorbţie specifică ce duce la formarea unui complex enzimă-substrat, numai că în loc de adsorbţia substratului la enzimă are loc adsorbţia enzimei la interfaţa dintre substratul emulsionat şi faza apoasă în care se găseşte enzima. Când cantitatea de fază emulsionată este mică, majoritatea enzimei rămâne în soluţie şi viteza de hidroliză este redusă. Crescând cantitatea de fază emulsionată se favorizează adsorbţia lipazei şi

viteza de hidroliză creşte până în momentul când toate moleculele de enzimă se găsesc fixate la interfaţă, exercitându-şi acţiunea catalitică (Benzonana şi Desnuelle, 1965).

În cazul reacţiilor catalizate de lipaze în solvenţi organici, sistemul de reacţie se poate prezenta, în principiu, în două variante:

- sisteme de reacţie bifazice în care substratul insolubil în apă, dizolvat într-un solvent sau substratul lichid însuşi, este amestecat cu o soluţie apoasă de lipază (Zaks şi Klibanov, 1985).

- sisteme de reacţie în care enzima este suspendată într-un solvent organic sau solubilizată prin intermediul unui miceliu invers, existând doar o cantitate mică de apă care este dispusă în jurul macromoleculei enzimatice pentru a menţine conformaţia catalitic activă (Halling, 1989).

Se remarcă faptul că, în ambele situaţii, acţiunea lipazei are loc în mediu eterogen, la interfaţa a două faze nemiscibile, dintre care una este constituită din apă. Rezultă în mod logic că cinetica şi mecanismul reacţiilor catalizate de lipaze în solvenţi organici nu pot fi bine înţelese fără o aprofundare a cineticii hidrolizei trigliceridelor emulsionate, care a fost foarte mult studiată, mecanismele proceselor fiind probabil asemănătoare sau identice. Bineînţeles că fiind vorba de un proces extrem de complex, în care intervin o mulţime de factori, modul de abordare a studiului cinetic diferă mult de la autor la autor, iar uneori şi concluziile la care se ajunge sunt diferite. În continuare vor fi prezentate câteva modele cinetice din literatura de specialitate care au fost considerate semnificative pentru reacţiile catalizate de lipaze.

5.2.1. Cinetica hidrolizei trigliceridelor emulsionate

Una din caracteristicile cele mai importante şi interesante ale acestor reacţii o constituie activarea enzimei la interfaţă. Diferenţa esenţială dintre lipaze şi esteraze este chiar această activare la interfaţă în cazul primelor. Această particularitate apare nu numai în cazul emulsiilor ci de exemplu şi la adsorbţia gliceridei pe granule sferice de sticlă siliconică, situaţie în care se formează de asemenea o interfaţă. S-a arătat că în acest mod viteza de hidroliză a tripropionatului de glicerină creşte de 1000 de ori (Brockman, Law şi Kézdy, 1973).

Definirea şi măsurarea concentraţiei substratului insolubil constituie un prim obstacol în calea studierii cineticii enzimatice la interfaţă. În cinetica Michaelis - Menten clasică, concentraţia substratului se exprimă în moli/L. Reacţiile care au loc la interfaţa ulei-apă dobândesc un caracter bidimensional, ceea ce determină o dependenţă importantă a cineticii de starea fizică a substratului şi nu atât de concentraţia lui.

Pentru a explica mersul lipolizei, o serie de cercetători au propus o adsorbţie reversibilă la, sau o pătrundere a enzimei în interfaţă. Pe lângă aceasta, s-a presupus că prima etapă precede formarea complexului enzimă-substrat şi poate fi în anumite condiţii etapa determinantă de viteză.

Un model cinetic al acţiunii enzimei la interfaţă este prezentat în Figura 5.3. (Verger, 1980).

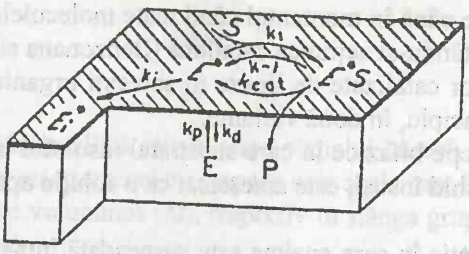


Figura 5.3. Modelul cinetic al acțiunii lipazei la interfața ulei-apă

Au loc două echilibre succesive. Prima constă în pătrunderea enzimei solubilizate în apă în interfață ($E \rightleftharpoons E^*$). În al doilea echilibru, o moleculă de enzimă pătrunsă în interfață leagă o moleculă de substrat, dând complexul E*S. Acesta reprezintă echivalentul echilibrului Michaelis-Menten clasic în sistem bidimensional. Odată ce s-a format complexul E*S are loc etapa catalitică, regenerând enzima în forma E* odată cu eliberarea produşilor. Ulterior, la această schemă s-a adăugat o etapă de transformare a enzimei din forma E* într-o formă inactivă E_i^*, fapt constatat experimental într-o serie de cazuri. Ca o consecință a acestor etape consecutive de pătrundere şi inactivare, ne putem aştepta ca cinetica lipolizei să fie controlată calitativ de o interfață de adsorbție , responsabilă pentru o perioadă inițială de rămânere în urmă şi de o influență de inactivare, care duce la scăderea vitezei de reacție. Cineticile sunt strict liniare fie dacă cele două influențe se echilibrează temporar, fie dacă etapa de penetrare este rapidă şi viteza de inactivare este neglijabilă (Verger, 1980).

Se poate considera că pătrunderea enzimei în interfață conferă enzimei o conformație nouă (E*) având o eficiență catalitică mult mărită față de enzima solubilă (E). Etapa de pătrundere este deci distinctă de orice adsorbție mai generală şi nespecifică ce putea să o precede. Modificarea conformațională a fost confirmată de măsurători spectroscopice la anumite lipaze. Trebuie menționat că acest model este valabil nu numai pentru enzimele lipolitice, ci şi pentru orice enzime solubile care acționează asupra unui substrat insolubil.

Utilizând drept substrat o emulsie de ulei de măsline, s-a demonstrat că lipaza se adsoarbe pe particulele emulsionate şi că această adsorbție urmează o izotermă de tip Langmuir. În continuare s-a măsurat activitatea lipazei în funcție de cantitatea de emulsie (exprimată în unități arbitrare). Corelația observată dintre adsorbție şi activitatea enzimei poate fi exprimată prin următoarea schemă (Cornish-Bowden, 1984):

$$E_{(soluție)} + S_{(emulsie)} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [ES]_{(emulsie)} \xrightarrow{k_3} P$$

Asemănarea formală a acestei scheme cu binecunoscutul model Michaelis-Menten a tentat mulţi cercetători să determine constantele K_m şi V_{max} pentru enzime ce acţionează asupra unor substraturi insolubile. Benzonana şi Desnuelle au demonstrat influenţa pe care o are cantitatea de interfaţă, determinată de mărimea picăturilor de emulsie, asupra constantei Michelis K_m . Ei au comparat vitezele de lipoliză în cazul unor emulsii grosiere şi fine şi au găsit valori diferite pentru K_m (Figura 5.4, •---•). Dacă însă concentraţia substratului este exprimată în unităţi de suprafaţă/volum în loc de masă/volum, reprezentările Lineweaver-Burk pentru cele două emulsii ale aceluiaşi substrat coincid şi se obţine o singură valoare K_m, indiferent de gradul de dispersie (Figura 5.4, o---o).

Importanţa determinării unei constante superficiale K_m care să aibă dimensiuni exprimate în suprafaţă/volum în loc de masă/volum a fost pusă sub semnul întrebării de alţi cercetători. Astfel, Brockerhoff susţine că o astfel de constantă K_m trebuie să fie constanta de disociere a complexului enzimă-interfaţă (k_3 fiind foarte mic), fiind independentă de natura chimică a substratului şi presupune că exact aceleaşi valori ale lui K_m vor fi găsite pentru combinaţii cu totul diferite de interfaţă ulei-apă şi proteină, adică interfeţele ulei-apă s-ar comporta ca suprafeţe nespecifice care adsorb numeroase proteine cu aceeaşi afinitate (Verger, 1980). Mattson susţine că orientarea moleculei de ester la interfaţa ulei-apă şi specificitatea enzimei pentru substratul respectiv sunt principalii factori care determină viteza de hidroliză. În realitate, se pare că această controversă este doar aparentă, deoarece nu s-a investigat aceeaşi etapă a reacţiei lipolitice. Brockerhoff şi Mattson au utilizat concentraţii superficiale saturate ale substratului, în care toate moleculele de enzimă erau adsorbite la interfaţă şi au studiat afinitatea enzimei pentru substratul său specific la interfaţă. De aceea, ei susţin, probabil în mod justificat, că orientarea moleculei de substrat la interfaţa ulei-apă este cel mai important factor al lipolizei. Benzonana şi Desnuelle, pe de altă parte, au studiat adsorbţia enzimei solubilizate în apă la interfaţa apă-lichid, etapă ce precede reacţia la interfaţă şi au definit o constantă de afinitate între enzimă şi interfaţă, definiţie ce accentuează influenţa mărimii suprafeţei emulsiei asupra vitezei reacţiei enzimatice.

Trebuie menţionat că determinarea unei constante superficiale K_m necesită ca interfaţa ulei-apă să rămână neschimbată în cazul experimentului, deoarece cantitatea enzimei adsorbite variază în funcţie de calitatea interfeţei ulei-apă. O obiecţie mai serioasă la propunerea lui Benzonana şi Desnuelle de a determina valoarea constantei superficiale K_m în unităţi de suprafaţă/volum este de natură practică şi anume că este relativ greu a se determina precis aria suprafeţei picăturilor de emulsie. În plus, dacă se folosesc substanţe tensioactive la stabilizarea emulsiei, exprimarea lui K_m în unităţi de suprafaţă/volum este îndoielnică, deoarece nu se cunoaşte suprafaţa ocupată de emulgator la interfaţă.

Acesta este principalul argument pentru care cercetătorii care au studiat cinetica reacţiilor enzimatice la interfaţă au căutat interfeţe ulei-apă care pot fi caracterizate mai bine decât emulsiile.

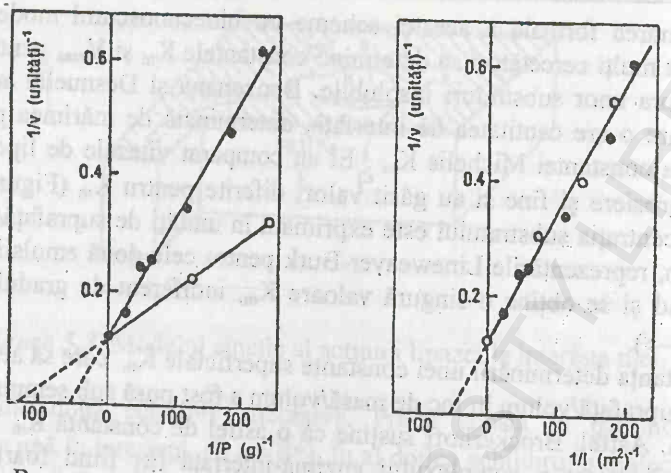


Figura 5.4. Reprezentarea Lineweaver-Burk pentru lipoliza a două emulsii de ulei, grosieră (•---•) și fină (o---o)

Până acum s-a discutat despre substraturi emulsionate, care favorizează formarea unor picături de emulsie destul de mari. Pentru stabilizarea acestor emulsii se folosesc adeseori cantități mici de agenți activi de suprafață, care se concentrează la interfața ulei-apă și la atingerea concentrației critice micelare formează sisteme micelare disperse. Aceste soluții sunt transparente, prezentând marele avantaj că miceliul poate fi ușor atacat de enzimă și se obțin deseori cinetici liniare datorită îndepărtării produșilor de reacție de la interfața ulei-apă. În acest scop se utilizează, săpunuri, detergenți ca dodecilsulfonatul de sodiu, săruri ale acizilor biliari, Triton X-100 și altele. În plus, micșorarea valorii pK a acizilor grași cu catenă lungă în prezența anumitor detergenți face posibilă efectuarea titrărilor continue în instalații de tip pH-stat.

Pentru a explica activarea la interfață a lipazelor, care așa cum s-a arătat înseamnă o creștere importantă a vitezelor de reacție, s-au emis o serie de ipoteze (Verger, 1980).

a. Creșterea concentrației moleculelor de substrat la interfață este cea mai simplă și aparent logică explicație, dar care nu poate, singură, justifica creșteri ale vitezei de reacție de 10^3-10^4 ori.

b. Scăderea energiei de activare prin agregarea substratului a fost susținută de mai mulți autori, considerând că agregarea prin ea însăși duce la scăderea entropiei sistemului prin pierderea energiei de rotație și de translație și, în plus, orientarea moleculei de substrat la interfață favorizează mult mai mult interacțiunea cu enzima decât în cazul unor monomeri liberi aflați în soluție.

c. Starea de hidratare a substratului este mai redusă la interfață în raport cu cea existentă în soluția apoasă. Deoarece se consideră că moleculele de apă care asigură hidratarea substratului împiedică atacul enzimei, al cărei centru activ este

caracterizat de o nucleofilicitate slabă, prin agregarea şi dehidratarea substratului la interfaţă viteza reacţiei va creşte.

d. Aria interfeţei pe moleculă de substrat sau tensiunea superficială constituie, după unii autori, un factor determinant al vitezei de lipoliză. Determinarea experimentală a acestei influenţe este însă destul de dificilă şi rezultatele în această direcţie nu sunt concludente.

e. Orientarea şi modificarea conformaţiei enzimei la interfaţă pare o explicaţie logică a activării enzimei, care caută să dobândească o orientare în care centrul său activ să ajungă în contact cu o singură moleculă de substrat pe care o transformă. A fost emisă şi ipoteza prezenţei unei zone, distincte în raport cu centrul activ şi responsabilă pentru fixarea reversibilă a proteinei la interfaţă (Brockerhoff, 1974). Desnuelle a denumit această zonă centru de recunoaştere interfacială, iar alţi cercetători au adus dovezi experimentale în direcţia existenţei sale, aşa cum se va discuta mai departe.

Kosugi şi Suzuki au elaborat un model cinetic al reacţiei de hidroliză a trigliceridelor, care poate reda evoluţia în timp a acestor reacţii (Kosugi şi Suzuki, 1983).

Întrucât este dificil să se ţină cont de existenţa a două reacţii consecutive de echilibru, desfăşurarea în timp a reacţiei poate fi privită ca un proces de hidroliză a legăturilor esterice cu formarea unui acid şi a unui derivat de alcool.

$$S + H_2O \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} P_1 + P_2$$

Deoarece lipaza hidrolizează numai legăturile esterice din poziţiile 1 şi 3, concentraţia iniţială de legături esterice hidrolizabile este: $(LEH)_i = 2 \cdot s_0$, unde prin s_0 am notat concentraţia iniţială a trioleinei. Gradul de hidroliză la un anumit moment t al reacţiei poate fi exprimat prin următorul raport:

$$r = (LEH)_t / (LEH)_i$$

unde $(LEH)_t$ reprezintă concentraţia de legături esterice hidrolizate până în momentul t egală cu concentraţia molară a acidului rezultat.

Reprezentând grafic gradul de hidroliză r în funcţie de timp rezultă o curbă cu alură hiperbolică ce seamănă cu curba de saturaţie a unei izoterme de adsorbţie şi poate fi descrisă de o funcţie de forma:

$$r = \frac{t}{at + b} \qquad (5.1)$$

Când t tinde spre infinit:

$$r = \frac{1}{a} = R \qquad (5.2)$$

deci punctul de saturare al hiperbolei corespunde gradului de hidroliză final, la echilibru, R. Timpul T în care s-au hidrolizat jumătate din legăturile esterice disponibile este :

$$\frac{R}{2} = \frac{T}{aT + b} \qquad (5.3)$$

de unde rezultă:

$$T = \frac{b}{a} \qquad (5.4)$$

Ecuația (5.1) poate fi rescrisă în funcție de parametrii R şi T obținând relația (5.5), care se poate liniariza, permițând determinarea valorilor parametrilor T şi R din reprezentarea grafică $1/r = f(1/t)$:

$$r = \frac{t}{\frac{1}{R}t + \frac{T}{R}} \text{ ; sau } \qquad r = \frac{1}{\frac{1}{R} + \frac{T}{R} \cdot \frac{1}{t}} \qquad (5.5)$$

$$\frac{1}{r} = \frac{T}{R} \cdot \frac{1}{t} + \frac{1}{R} \qquad (5.6)$$

Determinarea parametrilor R şi T pentru un anumit sistem permite estimarea gradului de hidroliză la un anumit timp de reacție, respectiv a timpului de reacție după care se va atinge un anumit grad de hidroliză. Considerând schema de reacție dată, se poate exprima concentrația de produs format în funcție de concentrația substratului:

$[P_1] = [P_2] = s_0 - s$ unde s este concentrația de substrat în momentul t al reacției.

Expresia ecuației de viteză pentru reacția de hidroliză a trigliceridelor, considerată reacție de ordinul doi cu două substraturi este :

$$-\frac{ds}{dt} = k_1[S][H_2O] - k_{-1}[P_1][P_2] \qquad (5.7)$$

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Concentrația apei se poate considera constantă, fiind mult mai mare decât a esterului, deci ecuația de viteză devine :

$$-\frac{ds}{dt} = k_1' \cdot s - k_{-1}(s_0 - s)^2 \tag{5.8}$$

Gradul de hidroliză r la un moment dat t al reacției se poate exprima în funcție de concentrația substratului s:

$$r = \frac{s_0 - s}{s_0} \tag{5.9}$$

Pornindu-se de la ecuația de viteză (5.8), au fost stabilite următoarele relații pentru constantele de viteză ale reacțiilor directă și inversă, precum și pentru variația gradului de hidroliză în funcție de timp:

$$k_1' = \frac{R}{R-2} \cdot \frac{1}{T} \cdot \ln\left(\frac{1}{3-R}\right) \tag{5.10}$$

$$k_{-1} = \frac{1-R}{R^2} \cdot \frac{1}{s_0} \cdot k_1' \tag{5.11}$$

$$r = \frac{(1-\alpha) \cdot R}{1 + (1-R) \cdot \alpha} \tag{5.12}$$

unde:

$$\alpha = \left(\frac{1}{3-R}\right)^{\frac{t}{T}}$$

Există deci două modalități de a calcula gradul de hidroliză în funcție de timp, fie cu ajutorul ecuației (5.5), fie cu ajutorul ecuației (5.12). Diferența constă în faptul că pornind de la valorile constantelor R și T determinate pe baza datelor experimentale prin optimizarea ecuației (5.5), se pot calcula valorile constantelor de viteză k_1' și k_{-1}.

Acest model a dat rezultate apropiate de cele experimentale în cazul reacției de hidroliză a seului de vită cu lipază din *Pseudomonas fluorescens*.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.2.2. Cinetica hidrolizei enzimatice cu lipaze în sisteme bifazice apă-solvenți organici

S-a constatat de mai mulți cercetători că în prezența solvenților organici și a substanțelor tensioactive a crescut stabilitatea emulsiilor și viteza de hidroliză a trigliceridelor. Acest lucru a fost pus în legătură cu modificarea stării de hidratare a substratului, așa cum s-a arătat în capitolul precedent.

Astfel de solvenți s-au dovedit a fi izooctanul, n-heptanul și n-hexanul (Mukataka, Kobayashi și Takahashi, 1985). Cele mai bune rezultate s-au obținut în cazul includerii enzimei în micelii inverse apă-agent tensioactiv în solvenți organici. Asemenea micelii se formează în condiții strict determinate și există doar un număr redus de agenți tensioactivi și solvenți organici ce pot fi utilizați în acest scop.

Mukataka ș.a. au propus un model cinetic pentru sistemele de reacții bifazice solvent organic/apă catalizate de enzime, model ce a fost testat pe reacția de hidroliză a seului de vită cu lipază din *Candida cylindracea* (Mukataka, Kobayashi și Takahashi, 1985). În asemenea sisteme, în care triglicerida este dizolvată în solventul organic, în timp ce lipaza este dizolvată într-o soluție apoasă (în general o soluție tampon), reacția are loc tot la interfață. Ecuația vitezei de reacție trebuie să clarifice mecanismul facilitării reacției de către solventul organic, să cuprindă influența raportului celor două faze și a ariei interfaciale dintre acestea.

S-a plecat de la o schemă de reacție de tip Michaelis-Menten clasică:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \longrightarrow E + P$$

Concentrația complexului enzimă-substrat se consideră a fi constantă. Dacă se notează cu $(E)_i$, $(S)_i$ și $(ES)_i$ concentrațiile enzimei, substratului și complexului enzimă-substrat la interfață, se poate scrie:

$$\frac{d(ES)_i}{dt} = (E)_i \cdot (S)_i - \left(k_{-1} + k_2\right) \cdot (ES)_i = 0 \qquad (5.13)$$

Pentru simplificarea mecanismului, s-a presupus că fiecare din aceste concentrații este proporțională cu concentrația speciei respective în faza apoasă, respectiv în faza de solvent organic :

$$(E)_i = \frac{C_1 E}{V(1-\theta)} \qquad (5.14)$$

$$(S)_i = \frac{C_2 S}{V \cdot \theta} \qquad (5.15)$$

unde E şi S reprezintă numărul de molecule de enzimă şi respectiv substrat în sistemul de reacţie, V este volumul total al amestecului de reacţie, θ fracţiunea de solvent organic ce conţine triglicerida, iar C_1 şi C_2 sunt constante de proporţionalitate.

Dacă se notează cu a aria interfacială raportată la unitatea de volum de amestec de reacţie, iar cu (E_0) şi (S) concentraţiile totale ale enzimei şi substratului în amestecul de reacţie, ecuaţiile (5.14) şi (5.15) devin:

$$(E)_i = \frac{C_1}{1-\theta}[(E_0) - a(ES)_i] \qquad (5.16)$$

$$(S)_i = C_2 \frac{S}{\theta} \qquad (5.17)$$

După înlocuirea ecuaţiilor (5.16) şi (5.17) în ecuaţia (5.13) s-a obţinut pentru concentraţia complexului enzimă-substrat la interfaţă relaţia:

$$(ES)_i = \frac{\frac{1}{a}(E_0)(S)}{\frac{(k_{-1}+k_2)\cdot\theta\cdot(1-\theta)}{k_1\cdot C_1\cdot C_2\cdot a}+(S)} = \frac{\frac{1}{a}(E_0)(S)}{K_m\frac{\theta(1-\theta)}{a\cdot C_1\cdot C_2}+(S)} \qquad (5.18)$$

unde: $$K_m = \frac{k_{-1}+k_2}{k_1}$$

În consecinţă, viteza de formare a produsului, raportată la unitatea de volum, se poate reda prin ecuaţia:

$$v = k_2\cdot(ES)_i\cdot a = \frac{k_2\cdot(E_0)(S)}{K_m\cdot\frac{\theta}{\frac{1-\theta}{a\cdot C_1\cdot C_2}}+(S)} = \frac{V_m(S)}{K_m'+(S)} \qquad (5.19)$$

unde : $V_m = k_2\cdot(E_0)$

$$K_m' = K_m\cdot\frac{\frac{\theta}{1-\theta}}{a\cdot C_1\cdot C_2} \qquad (5.20)$$

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se observă că s-a obținut o ecuație finală (5.19) similară unei ecuații de tip Michaelis-Menten pentru sistemele de reacție omogene.

Din ecuația (5.20) se vede că valoarea constantei Michaelis aparente K_m' se schimbă în funcție de fracțiunea fazei de solvent organic, chiar dacă constantele de viteză nu se modifică. Ecuația (5.18) nu cuprinde efectul inhibiției produșilor asupra vitezei de reacție, de aceea nu poate fi utilizată pentru modelarea cinetică a evoluției reacției în timp, ci doar pentru investigarea efectului solventului organic asupra parametrilor V_m și K_m pe baza datelor de viteză inițială.

Lipaza își menține activitatea catalitică și în microemulsii de tip apă în ulei (W/O) (așa-numitele micelii inverse), în prezența unui agent tensioactiv, care poate fi *bis*-(2-etil-hexil)-sulfosuccinatul de sodiu (AOT). Fletcher și Robinson au studiat cinetica hidrolizei într-un astfel de tip de microemulsie, conținând apă, n-heptan și AOT (Fletcher ș.a., 1985).

Întrucât lipaza nu este solubilă în heptan, se va găsi exclusiv în interiorul picăturilor de microemulsie apoasă, în timp ce substratul esteric se va găsi de preferință în interiorul fazei organice. Schema de reacție poate fi redată într-o primă aproximație astfel (Figura 5.5).

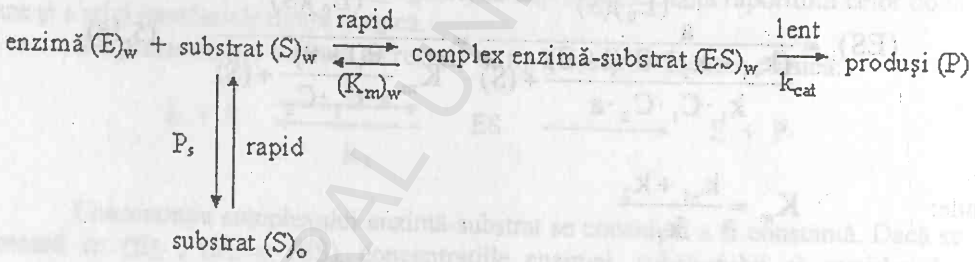


Figura 5.5. Cinetica reacțiilor catalizate de lipază în microemulsii

Indicii w și o înseamnă localizarea speciei respective în interiorul picăturii de apă sau în faza organică. $(K_m)_w$ este constanta Michaelis a formării complexului enzimă-substrat, iar k_{cat} este constanta de viteză pentru reacția de descompunere a complexului Michaelis.

P_s este coeficientul de repartiție al substratului, egal cu raportul concentrațiilor în cele două faze:

$$P_s = \frac{[S]_w}{[S]_o} \qquad (5.21)$$

Pentru viteza inițială a reacției se poate scrie expresia:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot [E]_T \cdot [S]_T}{(K_m)_{ap} + [S]_T} \quad (5.22)$$

unde indicele T indică faptul că concentrația este exprimată ca număr de moli pe unitate de volum total a mediului microemulsionat (și nu a unuia din cele două pseudofaze).

Constanta Michaelis aparentă $(K_m)_{ap}$ este dependentă de constanta reală $(K_m)_w$ în pseudofaza apoasă (în care are loc reacția) prin intermediul relației:

$$(K_m)_{ap} = \frac{(K_m)_w \cdot [1 + \theta(P_s - 1)]}{P_s} \quad (5.23)$$

unde θ este fracția volumetrică a pseudofazei apoase.
În cazul unei substrat solubil în apă ($P_s >> 1$) avem

$$(K_m)_{ap} = (K_m)_w - \theta \quad (5.24)$$

iar pentru un substrat solubil în faza organică ($P_S << 1$) obținem:

$$(K_m)_{ap} = \frac{(K_m)_w(1-\theta)}{P_s} = \frac{(K_m)_w}{P_s} \quad \text{dacă} \quad \theta << 1 \quad (5.25)$$

Acest model cinetic a fost aplicat la hidroliza p-nitrofenil-octanoatului cu lipază din *Chromobacterium viscosum*. Reprezentarea Lineweaver-Burk a avut forma unei drepte, ceea ce arată că poate fi considerată o cinetică de tip Michaelis-Menten.

Întrucât $(K_m)_{ap}$, care este o constantă de disociere, este mult mai mare decât $[S]_T$, ecuația (5.25) poate fi scrisă sub forma:

$$v = \frac{k_{cat} \cdot [E]_T \cdot [S]_T}{(K_m)_{ap}} \quad (5.26)$$

În practică este mai simplu să se definească o constantă de ordinul 2, k_2:

$$v = k_2 [E] [S]_T \quad (5.27)$$

unde:

$$k_2 = C\frac{k_{cat}}{(K_m)_{ap}} = C\frac{k_{cat} \cdot P_s}{(K_m)_w} \quad (5.28)$$

BCU IAȘI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

în care C este o constantă şi este necesară deoarece concentraţia enzimei este aici exprimată în g/cm^3 de soluţie totală, masa moleculară a enzimei fiind necunoscută. Aşadar k_2 se exprimă în unităţi de $cm^3 \cdot g^{-1} \cdot s^{-1}$. Experimental s-au determinat influenţele diferiţilor parametri asupra constantei k_2. S-a constatat însă că microemulsiile reprezintă un sistem mult mai complex, faţă de care modelul cinetic adoptat s-a dovedit a fi prea simplificat.

Modelul cinetic cu un singur substrat care a fost prezentat în capitolul anterior (Kosugi şi Suzuki, 1983) are dezavantajul că nu ţine cont de influenţa apei asupra echilibrului hidrolitic al reacţiei, considerându-se că concentraţia acesteia rămâne constantă. Acest lucru este valabil în cazul reacţiilor de hidroliză în emulsii apoase, unde excesul de apă este foarte mare, dar nu şi în cazul când reacţia are loc în sistem bifazic, în micelii inverse AOT-solvent organic. Han şi Rhee au îmbunătăţit modelul precedent adoptându-l pentru aceste sisteme. Relaţia obţinută modelează valoarea conversiei parţiale (X) în funcţie de timp (t) (Han, Rhee şi Lee, 1987).

$$X = \frac{(1-\alpha)\cdot X_e}{1+\left[1-\left(1+\frac{A_0}{W_0}\right)X_e\right]\cdot\alpha} \qquad (5.29)$$

unde $$\alpha = \left[3-\left(1+\frac{A_0}{W_0}\right)X_e\right]^{-\frac{t}{t_m}} \qquad (5.30)$$

iar t_m este timpul de reacţie după care se ajunge la

$$X = X_e / 2.$$

A_0 reprezintă concentraţia iniţială a substratului hidrolizat, W_0 concentraţia iniţială a apei, iar X_e conversia la echilibru.

În condiţiile în care excesul de apă este mare, raportul $A_0 \cdot X_e / W_0$ din ecuaţia (5.29) tinde spre zero şi ecuaţia (5.29) devine identică cu relaţia găsită de Kosugi şi Suzuki. Acest model a fost experimentat în reacţia de hidroliză a uleiului de măsline cu lipază din *Candida cylindracea* într-un sistem de micelii inverse AOT-izooctan. S-a constatat că conversia maximă a esterului a crescut în general cu creşterea concentraţiei iniţiale de apă, cea ce confirmă faptul că acest sistem poate fi considerat ca o reacţie cu două substraturi. Ecuaţia (5.29) permite anticiparea conversiei de echilibru, dacă se cunosc concentraţiile iniţiale şi constanta de echilibru a reacţiei (calculată dintr-o determinare anterioară).

Acest model îmbunătăţit a fost dezvoltat în continuare (Peter şi Preda, 2002), dovedindu-se aplicabil şi în reacţiile de esterificare şi transesterificare catalizate de lipază. Avantajul său principal este că permite determinarea unor parametri cinetici pe

baza unui singur experiment, iar aceşti parametri sunt utili de exemplu pentru caracterizarea specificităţii enzimei într-o anumită reacţie.

5.2.3. Cinetica reacţiilor de esterificare şi transesterificare în solvenţi organici, catalizate de lipaze

Realizarea reacţiilor de esterificare şi transesterificare catalizate de lipaze se poate face în sisteme bifazice, în care concentraţia apei trebuie redusă cât mai mult pentru a evita reacţia de hidroliză. Aşa cum s-a observat de mai mulţi cercetători, viteza acestor reacţii în solvenţi organici v_A creşte cu concentraţia substratului (A), în conformitate cu ecuaţia Michaelis-Menten:

$$v_A = \frac{V_A \cdot [A]}{K_A + [A]} \tag{5.31}$$

Mai târziu s-a propus un mecanism de tip ping-pong, incluzând formarea unui intermediar de tip acil-enzimă (Zaks şi Klibanov, 1985).

Când în amestecul de reacţie sunt prezente în acelaşi timp două substraturi (A şi B), se poate definii un factor competitiv α, drept raportul capacităţilor catalitice ale lipazei în cele două reacţii (Deleuze ş.a., 1987):

$$\alpha = \frac{\dfrac{V_A}{K_A}}{\dfrac{V_B}{K_B}} \tag{5.32}$$

Acest lucru este valabil şi pentru doi enantiomeri ai aceluiaşi substrat. Factorul competitiv poate fi calculat cu una din relaţiile următoare:

$$\frac{V_A}{V_B} = \alpha \cdot \frac{[A]}{[B]} \tag{5.33}$$

$$\log\left(\frac{[A]}{[A]_0}\right) = \alpha \cdot \log\left(\frac{[B]}{[B]_0}\right) \tag{5.34}$$

Dacă de exemplu se utilizează doi esteri ai aceluiaşi acid (AcX şi AcY) drept donori de acil, se poate calcula *un factor competitiv donor* α_D (Figura 5.5, săgeţile pline). Dacă se utilizează 2 acceptori (X şi Y), se poate calcula un *factor competitiv acceptor* α_A (Figura 5.6, săgeţile întrerupte):

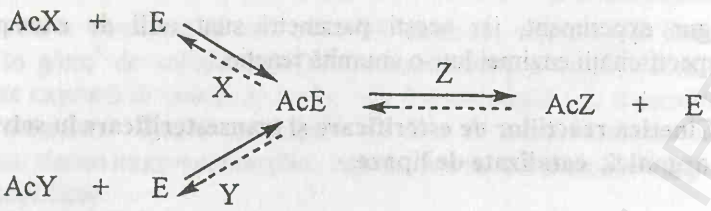


Figura 5.6. Modelul cinetic al reacțiilor cu două substraturi competitive

Factorii competitivi se calculează din reprezentarea variației concentrațiilor de substrat (A şi B) în funcție de timp, în conformitate cu ecuația (5.33).

Din valorile determinate experimental ale unor factori competitivi donori α_D pentru diferite cupluri de donori de acil AcX şi AcY, în reacții de transesterificare, s-a constatat că ele sunt independente de natura alcoolului utilizat ca acceptor de acil. De asemenea, valorile α_D au fost identice şi în cazul utilizării de lipaze microbiene de diferite proveniențe, cât şi la utilizarea a diferite concentrații de substrat. Se poate deci trage concluzia că avem de-a face cu o proprietate generală a reacțiilor în solvenți organici catalizate de lipaze.

În acelaşi context, s-a constatat că factorii competitivi acceptori α_A au aceleaşi valori indiferent de natura esterului (AcZ) utilizat ca donor de acil şi de natura lipazei folosite.

Utilizarea factorilor competitivi reprezintă o cale simplă de a descrie cinetica reacțiilor cu două substraturi, catalizate de lipaze. Trebuie însă menționat că acest lucru nu este valabil şi în cazul sistemelor bifazice unde, aşa cum s-a văzut, cinetica este mult mai complicată.

Domeniul de aplicare al modelului a fost extins în continuare pentru calculul constantelor de echilibru. Aplicând ecuația lui Haldane următorului echilibru:

$$AcX + Y \rightleftharpoons AcY + X \qquad (5.35)$$

se poate corela constanta de echilibru cu factorii competitivi (relația 5.36).

Factorii competitivi determinați pentru diferiți donori (AcX şi AcY) şi alcool lauric ca acceptor (Z), respectiv pentru diferiți alcooli (X,Y) ca acceptori şi tributirină (AcZ) ca donor, conform schemei din Figura 5.6, sunt redate în Tabelul 5.5.

$$K_{eq} = \frac{\alpha_D}{\alpha_A} = \frac{\dfrac{V_{AcX}}{K_{AcX}}}{\dfrac{V_{AcY}}{K_{AcY}}} \cdot \frac{\dfrac{V_Y}{K_Y}}{\dfrac{V_X}{K_X}} \qquad (5.36)$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 5.5. Valori calculate pentru factorii competitivi donori şi acceptori

(X, Y):	Factor competitiv donor AcX, AcY = butiril esteri Z = alcool lauric α_D	Factor competitiv acceptor AcZ = tributirină X, Y = alcooli α_A	α_D/α_A	K_{eq}
butil/izopentil	2,58 ± 0,10	3,91 ± 0,07	0,66	0,56
ciclohexil/ izopentil	3,66 ± 0,11	1,13 ± 0,07	3,2	3,1
ciclohexil/butil	1,39 ± 0,01	0,30 ± 0,29	4,6	4,9

Constantele de echilibru s-au calculat prin măsurarea concentraţiilor de substrat şi produs la echilibru, comparându-se cu valorile calculate din rapoartele α_D/α_A. Se poate observa că valorile sunt identice, în limita erorilor experimentale.

O aplicaţie importantă a acestui model este clasificarea donorilor, respectiv a acceptorilor de acil, în funcţie de factorii lor competitivi. Din rezultatele obţinute, luând drept referinţă butiratul de butil, se poate deduce următoarea scară a donorilor de acil (pentru lipaza din *Candida cylindracea*):

tributirină (20,9) > acid butiric (3,19) > butirat de ciclohexil (1,39) > > butirat de butil (1) > butirat de izopentil (1/2,66).

Aşadar se poate compara uşor reactivitatea unor donori de acil în reacţii de transesterificare în mediu organic. Pentru acceptorii de acil, se poate stabili următoarea ordine în cazul transferului grupei butiril cu lipază din *Candida cylindracea*:

butanol (3,7) > ciclohexanol (1,1) > apă (1,0) > izopentanol (0,95)

Acest model cinetic competitiv a fost extins de aceiaşi autori pentru a se putea simula evoluţia reacţiei de transesterificare (Langrand ş.a., 1988). Plecându-se de la schema de reacţie care a fost prezentată în figura 5.5, se pot scrie următoarele echilibre parţiale:

$$AcE + X \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} (XAcE) \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} AcX + E \qquad (5.37)$$

$$AcE + Y \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} (YAcE) \underset{k_{-4}}{\overset{k_4}{\rightleftharpoons}} AcY + E \qquad (5.38)$$

$$AcE + Z \underset{k_{-5}}{\overset{k_5}{\rightleftharpoons}} (ZAcE) \underset{k_{-6}}{\overset{k_6}{\rightleftharpoons}} AcZ + E \qquad (5.39)$$

unde E şi AcE reprezintă enzima liberă, respectiv acilată, Ac este gruparea acil care se transferă, iar (XAcE), (YAcE) şi (ZAcE) sunt complecşii enzimă-substrat corespunzători.

Dacă se cunosc concentraţiile la echilibru ale nucleofililor (X,Y), sistemul poate fi modelat prin analiza cinetică a ecuaţiilor (5.40) şi (5.41), conform modelului competitiv.

Viteza acilării lui X, pe care-l considerăm compusul care reacţionează mai repede, poate fi scrisă:

$$\frac{dAcX}{dt} = -\frac{dX}{dt} = k_2(XAcE) - k_{-2} \cdot AcX \cdot E \qquad (5.40)$$

În condiţiile stării staţionare, când d(XAcE)/dt = 0, avem:

$$(XAcE) = \frac{k_1}{k_2 + k_{-1}} AcE \cdot X + \frac{k_{-2}}{k_2 + k_{-1}} AcX \cdot E \qquad (5.41)$$

Combinarea ecuaţiilor (5.43) şi (5.44) duce la:

$$\frac{dAcX}{dt} = \frac{k_1 \cdot k_2}{k_{-1} + k_2} AcE \left[X - \frac{k_{-1} \cdot k_{-2}}{k_1 \cdot k_2} \cdot \frac{E}{AcE} \cdot AcX \right] \qquad (5.42)$$

Se introduc parametrii Michaelis (V_X, K_X) şi constanta de echilibru a ecuaţiei (5.37) (Ke_X):

$$V_X = k_2 \cdot E \cdot t$$

$$K_X = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

$$Ke_X = \frac{k_1 \cdot k_2}{k_{-1} \cdot k_{-2}} \qquad (5.43)$$

Relaţia (5.42) devine :

$$\frac{dAcX}{dt} = \frac{V_X}{K_X} \cdot \frac{AcE}{E_t} \cdot \left[X - \frac{E}{AcE - Ke_X} (X_0 - X) \right] \qquad (5.44)$$

unde E_t este concentraţia totală a enzimei, iar X_0 concentraţia molară iniţială a compusului X. Similar, pentru compusul Y se ajunge la relaţia :

$$\frac{dAcY}{dt} = \frac{V_Y}{K_Y} \cdot \frac{AcE}{E_t} \cdot \left[Y - \frac{E}{AcE \cdot Ke_Y} (Y_0 - Y) \right] \qquad (5.45)$$

Combinarea ecuațiilor (5.44) și (5.45) duce la relația independentă de timp:

$$\frac{dAcX}{dAcY} = \frac{\frac{V'_X}{K_X} \cdot \left[X - \frac{E}{AcE \cdot Ke_X} (X_0 - X) \right]}{\frac{V_Y}{K_Y} \left[Y - \frac{E}{AcE \cdot Ke_Y} (Y_0 - Y) \right]} \qquad (5.46)$$

Această expresie poate fi simplificată dacă se admite că raportul E/AcE este constant, ceea ce înseamnă că există condiția stării staționare pentru echilibrul redat de ecuația (5.47), independent de natura grupării acceptoare R (X,Y sau Z):

$$E + AcR \rightleftharpoons (RAcE) \rightleftharpoons R + AcE \qquad (5.47)$$

Aceste condiții ne dau :

$$\frac{E}{AcE} = Ke_X \cdot \frac{X_e}{X_0 - X_e} = Ke_Y \cdot \frac{Y_e}{Y_0 - Y_e} \qquad (5.48)$$

unde X_e și Y_e sunt concentrațiile molare respective la echilibru. Introducându-se în ecuația (5.46) factorul competitiv acceptor:

$$\alpha_A = \frac{\frac{V_X}{K_X}}{\frac{V_Y}{K_Y}}$$

avem:

$$\frac{dAcX}{dAcY} = \alpha_A \cdot \frac{1 - \frac{Y_e}{Y_0}}{1 - \frac{X_e}{X_0}} \cdot \frac{X - X_e}{Y - Y_e} \qquad (5.49)$$

sau:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\frac{dAcX}{dAcY} = A \cdot \frac{X - X_e}{Y - Y_e} \tag{5.50}$$

dacă se defineşte un factor de separare acceptor A:

$$A = \alpha_A \frac{1 - \frac{Y_e}{Y_0}}{1 - \frac{X_e}{X_0}} \tag{5.51}$$

Această constantă se poate calcula uşor cunoscând factorul competitiv α_A şi concentraţiile molare iniţiale, respectiv la echilibru ale componenţilor X şi Y.

Forma integrală a relaţiei (5.50) este:

$$\text{Log}\frac{X - X_e}{X_0 - X_e} = A \cdot \text{Log}\frac{Y - Y_e}{Y_0 - Y_e} \tag{5.52}$$

Introducând rapoartele molare ale produşilor în această relaţie obţinem:

$$\text{Log}\left(1 - \frac{AcX}{AcX_e}\right) = A \cdot \text{Log}\left(1 - \frac{AcY}{AcY_e}\right) \tag{5.53}$$

Expresii similare se obţin utilizând acelaşi raţionament pentru reacţia dintre doi compuşi donori de acil (AcX şi AcY) şi un acceptor (Z). În acest caz se defineşte o constantă numită factor de separare donor D:

$$D = \alpha_D \cdot \frac{1 - \frac{AcY_e}{AcY_0}}{1 - \frac{AcX_e}{AcX_0}} \tag{5.54}$$

ceea ce duce la următoarea relaţie între concentraţiile substraturilor:

$$\text{Log}\frac{AcX - AcX_e}{AcX_0 - AcX_e} = D \cdot \text{Log}\frac{AcY - AcY_e}{AcY_0 - AcY_e} \tag{5.55}$$

sau între concentraţiile produşilor:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\mathrm{Log}\left[1-\frac{X}{X_e}\right]=D\cdot\mathrm{Log}\left[1-\frac{Y}{Y_e}\right] \qquad (5.56)$$

Se observă că selectivitatea reacției este determinată de valoarea factorului de separare (A sau D).

Acest model cinetic a fost utilizat cu succes în cazul unor reacții de esterificare și de transesterificare în solvenți organici. De asemenea s-a putut aplica la obținerea enantioselectivă a unor alcooli cum ar fi D(-)-mentolul.

Utilizând factorii competitivi determinați pe baza rezultatelor cinetice ale reacțiilor de transesterificare dintre esterii etilici ai unor acizi grași C_2-C_{18} și n-propanol în solvenți organici, s-a stabilit o scală a reactivității diferiților donori de acil, ceea ce corespunde cu specificitatea lipazei față de acizii grași respectivi. Au fost testate mai multe lipaze comerciale. Se consideră că acest test simplu va fi foarte util pentru alegerea tipului de lipază care să fie utilizat la scară industrială pentru realizarea unei anumite reacții (Rangheard ș.a., 1989).

De asemenea, pe baza factorilor competitivi determinați din rezultatele cinetice ale reacțiilor de transesterificare dintre caprilatul de izoamil și seria omoloagă de alcooli primari de la metanol la dodecanol, respectiv o serie de alcooli cu grad diferit de substituție, s-a determinat specificitatea față de alcooli a 17 lipaze comerciale. S-a constatat că, în funcție de acestă specificitate, ele pot fi grupate în 5 categorii (Rangheard ș.a., 1992).

Miller ș.a. au studiat cinetica reacțiilor de transesterificare, considerând că acestea au loc în două etape: o hidroliză inițială, urmată de reesterificare. S-au măsurat și comparat vitezele celor două reacții pentru reacția de hidroliză a trilaurinei, urmată de esterificarea dilaurinei cu acid lauric în ciclohexan, catalizată de lipaza din *Candida cylindracea* (Miller, Prausnits și Blanch, 1991). Etapa inițială de hidroliză a trilaurinei s-a considerat că respectă un mecanism de tip acil-enzimă, așa cum a fost demonstrat de alți cercetători.

Schema de reacție este:

$$E + TL \underset{}{\overset{K_S}{\rightleftharpoons}} E\cdot TL \xrightarrow{k_2} E\text{-}LA + DL$$

$$E\text{-}LA + H_2O \xrightarrow{k_3} E + LA$$

unde E este lipaza, TL-trilaurina, DL-dilaurina, LA-acidul lauric, E-LA-acil enzima, K_S-constanta de echilibru, iar k_2 și k_3 constante de viteză.

Toate etapele reacției sunt reversibile, dar în faza inițială ea are loc numai de la stânga spre dreapta, așa cum se arată în schemă. Întrucât concentrația apei este mult mai mare decât cea a trilaurinei iar k_3 este în general mai mare decât k_2, expresia vitezei de reacție pentru acest mecanism poate fi scrisă:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [TL]}{K_m + [TL]} \tag{5.57}$$

iar V_{max} şi K_m pot fi exprimate în funcţie de k_2, k_3 şi K_S:

$$V_{max} = \frac{[E]_0 \cdot k_2 \cdot k_3}{k_2 + k_3} \tag{5.58}$$

$$K_m = \frac{K_S \cdot k_3}{k_2 + k_3} \tag{5.59}$$

V_{max} şi K_m pot fi determinaţi experimental modificând concentraţia trilaurinei şi măsurând vitezele iniţiale corespunzătoare.

Reacţia de esterificare dintre dilaurină şi acid lauric este inversa reacţiei de hidroliză. Acceptând ipoteza că mecanismul de tip acil-enzimă se aplică şi în acest caz, se poate scrie următoarea schemă de reacţie:

$$E + LA \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} E \cdot LA \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E\text{-}LA + H_2O$$

$$E\text{-}LA + DL \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} E \cdot TL \underset{k_{-4}}{\overset{k_4}{\rightleftharpoons}} E + TL$$

Acesta poate fi considerat un mecanism de tip ping-pong bi-bi, bazat pe ordinea adiţionării şi eliberării substraturilor şi produşilor. Dacă măsurăm vitezele iniţiale şi dacă dilaurina şi acidul lauric sunt singurele specii prezente în proporţii semnificative, putem presupune că reacţia are loc numai spre dreapta. În aceste condiţii expresia vitezei de reacţie devine:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [LA] \cdot [DL]}{K_{mDL}[LA] + K_{mLA}[DL] + [LA][DL]} \tag{5.60}$$

Expresiile termenilor K_m şi V_{max} sunt:

$$K_{mLA} = \frac{k_4(k_2 + k_{-1})}{k_1(k_2 + k_4)} \tag{5.61}$$

$$K_{mDL} = \frac{k_2(k_{-3} + k_4)}{k_3(k_2 + k_4)} \tag{5.62}$$

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$V_{max} = \frac{[E]_0 \cdot k_1 \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot k_4}{k_1 k_3 (k_2 + k_4)} \quad (5.63)$$

Valorile pentru K_m şi V_{max} se determină astfel: se măsoară viteza iniţială de esterificare în funcţie de concentraţia dilaurinei la diverse concentraţii de acid lauric. Se calculează o „valoare aparentă V_{max} pentru fiecare concentraţie de acid lauric. Reprezentând grafic $1/V_{max_{ap}}$ în funcţie de 1/[LA] ordonata la origine a dreptei ne dă valoarea $1/V_{max}$, iar panta acesteia este egală cu K_{mLA}/V_{max}. K_{mDL} se calculează similar din reprezentarea Lineweaver-Burk a cărei pantă este egală cu K_{mDL}/V_{max}.

S-a studiat şi efectul transferului de masă, determinându-se că acesta nu influenţează viteza de reacţie. Aşadar reacţia este controlată cinetic. De asemenea, s-a stabilit că, în condiţiile date, lipaza catalizează esterificarea de aproximativ trei ori mai rapid decât hidroliza.

Din datele prezentate se poate trage concluzia că cinetica reacţiilor catalizate de lipaze este deosebit de complexă, necesitând o abordare diferită în funcţie de condiţiile în care se desfăşoară: în emulsie apoasă, în sistem bifazic sau în mediu organic aparent lipsit de apă. Fiind vorba de reacţii care au loc în medii eterogene, determinarea constantelor cinetice fundamentale este dificilă, ea făcându-se în condiţiile unor aproximaţii care permit obţinerea de date cât mai apropiate de cele experimentale. Alte probleme apar datorită influenţei transferului de masă şi a proprietăţilor fizice ale interfeţei asupra cineticii reacţiilor catalizate de lipaze. Pentru simplificare este indicat să se lucreze în condiţii în care efectul transferului de masă să nu fie limitativ. Analiza cinetică a sistemelor de reacţie menţionate se face în cele mai multe cazuri pe baza determinării vitezelor iniţiale de reacţie.

5.2.4. Mecanismul catalitic al reacţiilor catalizate de lipaze

Aşa cum s-a arătat, compoziţia centrului activ al lipazei din pancreas de porc a constituit tema multor cercetări. Brockerhoff şi Jensen au susţinut că lipaza este o serin-enzimă iar Semeriva şi Desnuelle au afirmat că histidina se găseşte în centrul activ propriu-zis (Semeriva şi Desnuelle, 1979). După opinia lor, mecanismul catalitic al lipazei cuprinde trei etape: adsorbţia la interfaţă, activarea la interfaţă şi cataliza propriu-zisă. Serina şi un rest de aminoacid cu grupă carboxil s-a considerat că sunt implicate în primele două etape, iar histidina în ce-a de-a treia. Acest rol al histidinei a fost mai târziu pus sub semnul întrebării, considerându-se că histidina acţionează în procesele enzimatice în general ca un catalizator acid-bază, mărind nucleofilicitatea grupelor hidroxil şi tiol şi nu are rol de catalizator nucleofil. Toate aceste ipoteze au suferit de faptul că demonstrarea validităţii lor se putea face numai pe cale indirectă, neexistând metode de a observa direct şi de a modela structura centrului activ.

Momentul cel mai important în direcţia elucidării mecanismului reacţiilor catalizate de lipaze a fost determinarea structurilor tridimensionale ale acestor enzime. Prima asemenea determinare s-a făcut în anul 1990, când s-au determinat structurile

lipazelor din pancreasul uman şi din *Rhizomucor miehei*. De atunci, au fost determinate structurile altor unsprezece lipaze, care cu excepţia lipazei pancreatice sunt toate de origine microbiană. Toate aceste enzime prezintă o pliere caracteristică în structura lor secundară, numită pliere α/β hidrolazică. Zona centrală a lipazei este constituită dintr-o structură pliată ce cuprinde opt fire diferite (β1-β8), conectate prin şase α -helixuri (notate de la A la F). Centrul activ al lipazei este constituit dintr-o triadă catalitică ce cuprinde resturile de aminoacizi serină, acid aspartic (sau glutamic) şi histidină, confirmându-se ipoteza iniţială a lui Semeriva şi Desnuelle. Un exemplu de model tridimensional al unei lipaze microbiene, lipaza din *Pseudomonas aeruginosa*, construit pe baza unor determinări structurale cu raze X este prezentat în Figura 5.7 (Jaeger şi Reetz, 1998).

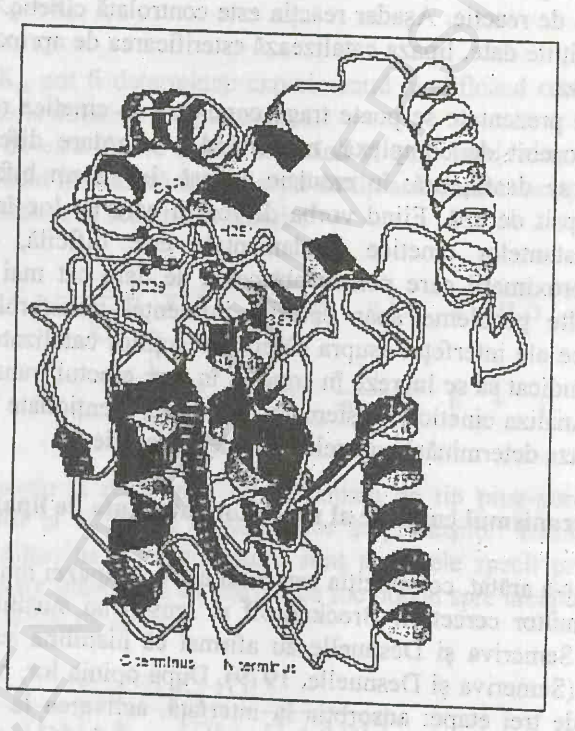


Figura 5.7. Modelul tridimensional al lipazei din *Pseudomonas aeruginosa*

β-plierile sunt reprezentate prin săgeţi de culoare închisă, iar structurile de α-elice sub forma unor serpentine. Resturile de aminoacizi din triada catalitică, Ser 82, Asp 229 şi His 251 sunt trecute explicit, iar poziţia probabilă a ionului de Ca^{2+} este indicată printr-un cerc. Elicea din zona dreapta sus simbolizează capacul elicoidal hidrofob, a cărei deplasare reprezintă esenţa activării interfaciale a lipazelor, deoarece centrul activ devine accesibil pentru substrat.

Restul de serină este localizat la capătul C-terminal al firului β-5 într-o formațiune pentapeptidică, cel mai adesea de tipul Gly-Xxx-Ser-Xxx-Gly. Hidroliza substratului începe cu atacul nucleofil al oxigenului serinic din triada catalitică la carbonilul grupării esterice, ducând la formarea unui intermediar tetraedric ce este stabilizat prin legături de hidrogen cu atomii de azot ce aparțin așa numitei "cavități oxianionice". În continuare este eliberat alcoolul, formându-se complexul acil-enzimă, care este în final hidrolizat, cu formarea acidului și eliberarea enzimei.

În Figura 5.8 este prezentat modelul centrului activ al lipazei din *Humicola lanuginosa*, având legat molecula de inhibitor dietil fosfonat (Svendsen, 2000). Se observă că cele trei resturi de aminoacizi din triada catalitică au altă poziție în structura primară decât în cazul lipazei din *Pseudomonas aeruginosa*, însă mecanismul este același. Cavitatea oxianionică este figurată prin restul de serină Ser 83, care este legat printr-o legătură de hidrogen de atomul de oxigen carbonilic, al fosfonatului în acest caz.

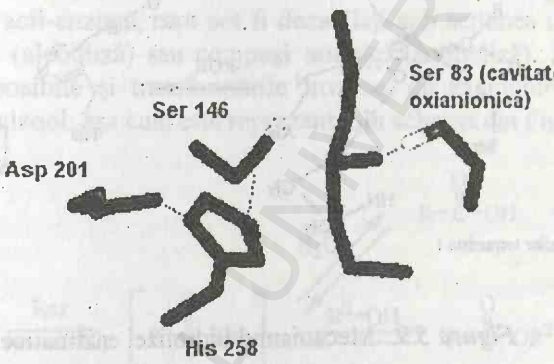


Figura 5.8. Modelul centrului activ al lipazei din *Humicola lanuginosa*

Mecanismul hidrolizei catalizate de lipaze implică fomarea unui intermediar acil-enzimă și a doi intermediari tetraedrici diferiți (Figura 5.9). Formarea intermediarului acil-enzimă conduce la formarea primului intermediar tetraedric. În această etapă se eliberează alcool, astfel această etapă determină selectivitatea lipazei față de alcooli. Formarea produsului prin atacul nucleofil asupra intermediarului acil-enzimă implică formarea celui de-al doilea intermediar tetraedric. Dacă dezacilarea este etapa determinantă de viteză, ea determină selectivitatea lipazei față de acizi (Bornscheuer și Kazlauskas, 1999).

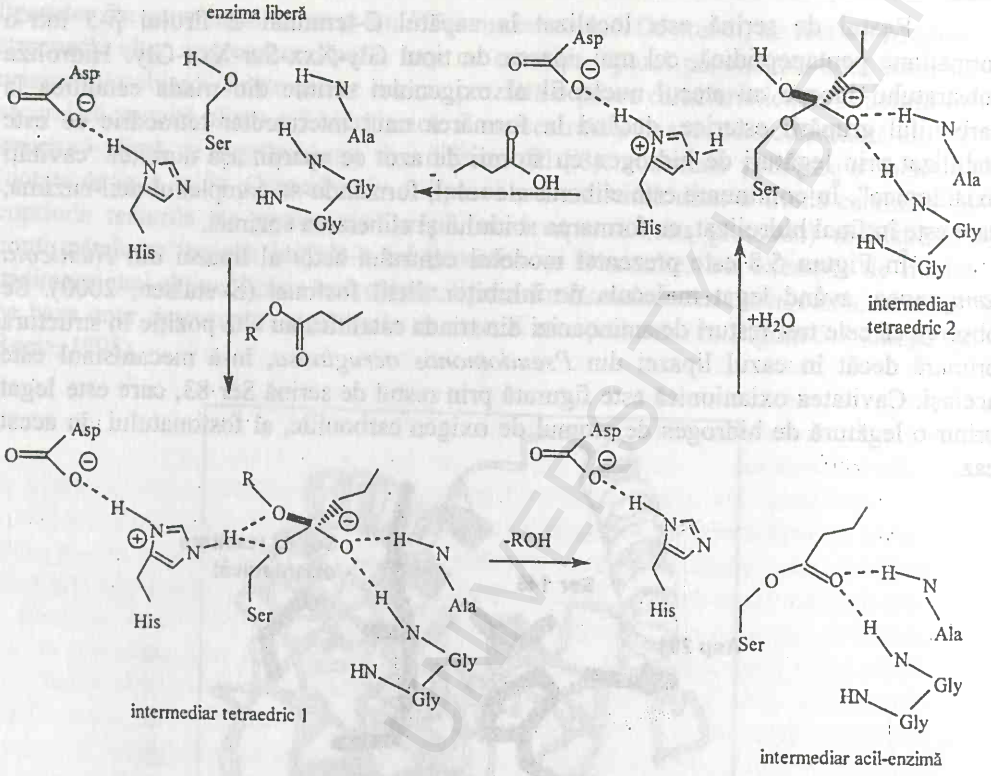


Figura 5.9. Mecanismul hidrolizei enzimatice

5.3. Utilizarea lipazelor drept biocatalizatori în sinteze organice

Există un număr foarte mare utilizări potențiale ale lipazelor, mai ales pentru obținerea de compuși biologic activi (Azerad, 1995; Zarevucka ș.a., 1995; Schmid și Verger, 1998; Davis și Boyer, 2001), compuși alimentari (Kilara și Shahani, 1979; Cantarelli, 1984, Pandey ș.a., 1999), și chiar a unor polimeri (Margolin, Crenne și Klibanov, 1987; Morrow și Wallace, 1990; Dordick, 1992). În afară de acestea, lipazele sunt utilizate și într-o serie de alte industrii cum ar fi cea a detergenților, care consumă aproximativ 32% (în jur de 1000 de tone) din lipazele comercializate în lume (Sharma, Chisti și Banerjee, 2001).

Lipazele sunt enzimele cu cele mai multe aplicații biocatalitice și un mare număr de cărți de specialitate conțin capitole consacrate acestor utilizări (Tramper, van der Plas și Linko, 1985; Laane, Tramper și Lilly, 1987; Davies ș.a., 1989; Tramper ș.a., 1992; Poppe și Novák, 1992; Faber, 1995; Drauz și Waldmann, 1995; Kazlauskas și Bornscheuer, 1998; Bornscheuer și Kazlauskas, 1999). Explicația acestui fenomen se bazează pe următoarele aspecte:

- Lipazele sunt enzime cu specificitate de substrat redusă, care deci pot cataliza transformarea unui mare număr de substraturi având structuri diferite. Pe de altă parte, au stereoselectivitate avansată, chiar față de substraturi nenaturale (Bornscheuer şi Kazlauskas, 1999).

- Lipazele fac parte din categoria enzimelor care îşi păstrează activitatea catalitică şi în amestecuri de reacţie predominant organice (Zaks şi Klibanov, 1985). Datorită solubilităţii crescute a reactanţilor, aceste sisteme oferă avantajul că lipazele devin catalizatori eficienţi pentru reacţii de sinteză (Halling, 1989). Un aspect important legat de utilizarea lipazelor este creşterea importantă a termostabilităţii lor în aceste condiţii (Zaks şi Klibanov, 1984).

- Există un număr mare de lipaze accesibile comercial în cantităţi mari şi la preţ redus faţă de alte enzime, iar faptul că nu necesită cofactori face procesele catalizate de lipaze mai simple şi mai avantajoase economic.

Mecanismul reacţiilor catalizate de enzimele hidrolitice implică formarea unor intermediari de tip acil-enzimă, care pot fi dezacilaţi sub acţiunea unor nucleofili: apă (hidroliză), alcooli (alcooliză) sau compuşi aminici (aminoliză). Aceste reacţii sunt reversibile, fiind posibile şi transformările inverse, de exemplu formarea esterului dintr-un acid şi un alcool, aşa cum este reprezentat în schema din Figura 5.10 (Sheldon, 1993).

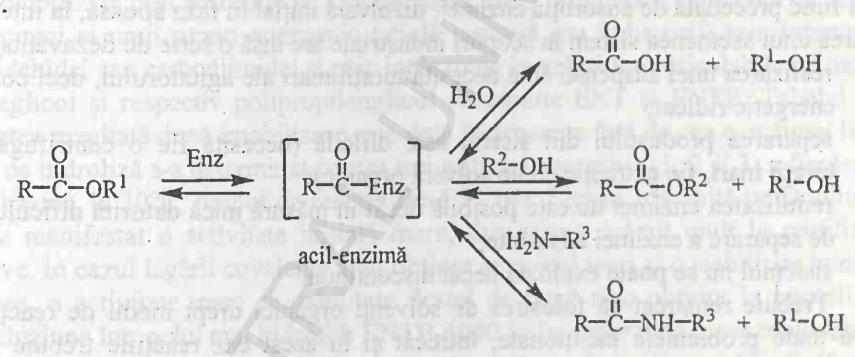


Figura 5.10. Transformări posibile catalizate de hidrolaze

În acest capitol vor fi prezentate unele utilizări ale lipazelor în reacţii din chimia organică, urmând ca cele aplicate industrial să fie prezentate într-un capitol separat, alături de alte tehnologii enzimatice. Utilizarea lipazelor ca biocatalizatori pentru sinteze organice a fost orientată pe două direcţii principale: reacţii de hidroliză şi reacţii de sinteză.

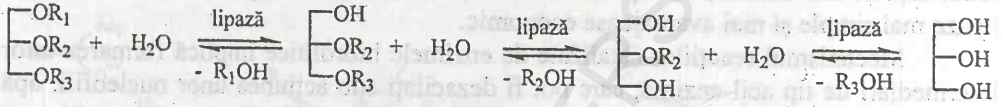
5.3.1. Reacţii de hidroliză

Lipazele, fiind enzime nespecifice, catalizează alături de hidroliza trigliceridelor şi reacţia de hidroliză a unei foarte diverse categorii de alţi esteri primari şi secundari, alifatici şi aromatici. Din punct de vedere practic de mare importanţă este

faptul că această hidroliză este adeseori enantioselectivă, permițând obținerea unor acizi şi alcooli optic activi, compuşi care pe căi clasice se sintetizează foarte greu.

5.3.1.1. Hidroliza trigliceridelor

Procesul industrial utilizat pe scară largă pentru obținerea acizilor graşi cu catenă lungă din uleiuri şi grăsimi naturale este procedeul Colgate-Emery. Acest procedeu are două dezavantaje principale: consumul energetic ridicat şi pierderile datorită trigliceridelor reziduale. Din acest motiv apare tentantă posibilitatea înlocuirii procedeului clasic cu un proces enzimatic ce se desfăşoară la temperatură şi presiune ambiantă (Yamane, 1987).



R_1, R_2, R_3 resturi acil de acizi graşi

Se ştie că lipazele acționează în sisteme eterogene, de tip emulsii ulei-apă, reacția fiind precedată de adsorbția enzimei, dizolvată inițial în faza apoasă, la interfață. Folosirea unui asemenea sistem în scopuri industriale are însă o serie de dezavantaje:

- realizarea unei suspensii fine necesită turații mari ale agitatorului, deci consum energetic ridicat;
- separarea produsului din sistem este dificilă (necesită fie o centrifugare la turații mari, fie extracție cu un solvent organic);
- reutilizatea enzimei nu este posibilă decât în măsură mică datorită dificultăților de separare a enzimei adsorbite;
- sistemul nu se poate exploata decât discontinuu.

Trebuie remarcat că folosirea de solvenți organici drept medii de reacție nu rezolvă toate problemele menționate, întrucât şi în acest caz reacțiile trebuie să se desfăşoare în sisteme bifazice emulsionate. În aceste condiții, o serie de cercetări pentru elaborarea unor tehnologii de hidroliză a uleiurilor şi grăsimilor catalizate de lipaze au fost orientate spre utilizarea enzimelor imobilizate, chiar dacă şi ele presupun utilizarea unor sisteme multifazice.

Studiile privind utilizarea lipazelor imobilizate pentru hidroliza trigliceridelor au fost axate pe următoarele direcții:

- creşterea randamentului în acizi graşi prin hidroliza enzimatică a trigliceridelor reziduale rămase nehidrolizate în procedeul clasic.
- găsirea unor suporturi pentru imobilizarea lipazelor care să permită efectuarea reacției de hidroliză a trigliceridelor în reactoare enzimatice cu operare semicontinuă sau continuă.
- hidroliza parțială a trigliceridelor cu lipaze 1,3-specifice, pentru a obține mono- şi digliceride.

Pentru a elimina inconvenientele tehnologice legate de utilizarea unui sistem trifazic substrat/apă/enzimă imobilizată, s-a studiat posibilitatea realizării hidrolizei trigliceridelor într-un sistem continuu, în solvenți organici (Bell și Todd, 1981). Drept catalizator s-au folosit micelii de *Rhizopus arrhizus*, iar ca solvent s-a utilizat diizopropileter. Încercările s-au făcut pe două tipuri de reactoare continue: cu pat fix și cu amestecare perfectă. S-a constatat că un reactor cu pat fix conținând un gram miceliu, la trecerea unei soluții de 2,5% (greutate /volum) ulei de măsline în diizopropileter cu o viteză volumetrică de 1 mL/min, la 30°C, duce la obținerea unui randament de 45 % în acizi grași. Conținutul optim în apă al sistemului s-a determinat a fi 0,17% (greutate/volum). În intervalul 20-50°C nu s-a observat un optim de temperatură. S-a ales temperatura de 30°C pentru a preîntâmpina dezactivarea prea rapidă a enzimei. Valorile calculate ale energiei de activare au fost între 13-20 kJ/mol, în funcție de temperatură, fiind mai mici decât cele raportate pentru lipază în emulsii apoase (21,9-100,4 kJ/mol în același domeniu de temperatură). Determinările experimentale efectuate nu au furnizat vreo dovadă în sensul că cinetica procesului ar fi limitată de difuziune. Scăderea activității catalizatorului a fost de 0,6-1% pe oră, la 30°C. Reactorul cu pat fix s-a dovedit mai bun decât cel cu amestecare perfectă.

Un studiu întreprins de Kimura ș.a. are ca temă hidroliza trigliceridelor cu lipaze imobilizate prin adsorbție pe Duolite sau Celite, prin legare covalentă pe derivați alchilaminici ai unui suport anorganic (sticlă poroasă sau Spherosil) prin intermediul glutaraldehidei sau carbodiimidei și prin incluziune în geluri fotoreticulabile pe bază de polietileglicol și respectiv polipropilenglicol (denumite ENT și ENTP, Tabelul 5.6). Activitatea rezultată după imobilizare este dată în procente față de cea a enzimei libere. Gradul de hidroliză s-a determinat pentru trei utilizări succesive (1, 2 și 3) a fiecărui tip de catalizator, la 30°C, timpul de reacție fiind 23 ore. Lipaza adsorbită pe Duolite sau Celite a manifestat o activitate inițială mare, dar care a scăzut mult la reutilizările succesive. În cazul legării covalente s-au obținut activități mari și o stabilitate bună. De asemenea, o activitate mare și stabilitate destul de bună s-au obținut la imobilizarea prin incluziune într gelul mai hidrofob ENTP-4000 (cifra reprezintă masa moleculară).

Viteza inițială de hidroliză este mai mică decât la lipaza liberă (factorul limitativ fiind probabil difuziunea acidului oleic în gel) dar după 23 de ore s-a ajuns la același grad de hidroliză. Temperatura optimă a enzimei imobilizate a fost 40°C, față de 30°C la cea liberă (Kimura ș.a., 1983).

Kosugi și Suzuki au constatat că imobilizarea lipazei din *Pseudomonas flourescens* prin adsorbție pe o rășină schimbătoare de ioni macroporoasă hidrofobă cum ar fi Dowex MWA-1 a dus la dispariția inhibiției datorate produsului de reacție în reacția de hidroliză a seului de vită și la creșterea stabilității împotriva denaturării chimice a enzimei (Kosugi și Suzuki, 1992).

Tabelul 5.6. Hidroliza uleiului de măsline cu lipază imobilizată din *Candida cylindracea*

Metoda de imobilizare (suport)	Activitate relativă (%)	Grad de hidroliză (%) Ciclul 1	Ciclul 2	Ciclul 3
Enzimă liberă	100,0	100,0	-	-
Adsorbție				
Duolite C-3	1,0	18,8	4,7	1,6
Duolite S-761	1,0	92,5	67,1	41,9
Celite	21,7	96,9	76,9	38,3
Legare covalentă				
Glutaraldehidă (alchilamină-sticlă poroasă)	3,7	92,9	97,4	93,0
Carbodiimidă (alchilamină-sticlă poroasă)	5,6	96,1	96,1	93,7
Glutaraldehidă (alchilamină-Spherosil)	1,1	59,9	71,7	70,0
Carbodiimidă (alchilamină-Spherosil)	12,5	96,9	86,5	86,5
Incluziune în gel				
ENT-4000	2,0	36,9	16,7	6,8
ENT-4000/ENTP-4000 (7:3)	10,0	83,7	57,8	35,0
ENTP-4000	11,1	88,1	78,3	77,3

Bailie ş.a. au utilizat de asemenea lipază imobilizată prin adsorbție pe suporturi hidrofobe, însă pe bază de polietilenă (Bailie ş.a., 1995). Lipaza din *Candida cylindracea* imobilizată pe un astfel de suport s-a utilizat pentru hidroliza seului de vită şi a uleiului de floarea-soarelui. La hidroliza uleiului de floarea-soarelui, folosind un reactor cu strat fix prevăzut cu o buclă de recirculare s-a atins un grad de hidroliză de 100% după 40 de ore la 30°C.

O altă variantă, ce utilizează însă un mediu de reacție conținând solvenți organici pentru hidroliza uleiului de măsline a fost elaborată de Yang şi Rhee. Lipaza din *Candida rugosa* a fost imobilizată prin legare ionică sau adsorbție fizică pe următoarele suporturi: DEAE Sephadex A-50, Sephadex G-50, Sephadex LH-20, Amberlite IRA-94 şi Amberlite XAD-7. Cele mai bune rezultate au fost obținute prin legare ionică pe DEAE Sephadex A-50. Enzima imobilizată a fost împachetată într-o coloană de sticlă care s-a operat continuu, uleiul de măsline dizolvat în solventul organic fiind introdus în echicurent cu soluția apoasă a enzimei, fără a se utiliza emulgator. Dacă s-a utilizat o soluție 20% de ulei de măsline în izooctan ca fază organică şi soluție tampon 25 mM de trietanolamină de pH 7,0 ca fază apoasă ce conținea enzima, timpul de înjumătățire a activității enzimei a fost de 220 h. Produsele reacției au fost acidul oleic şi glicerina (Yang şi Rhee, 1992).

O altă variantă tehnologică propusă este utilizarea unui reactor tip membrană care conține lipaza imobilizată, cu faza uleioasă pe o parte a membranei și faza apoasă pe cealaltă parte. Reactanții intră astfel în reactor pe fluxuri diferite, nefiind necesară emulsionarea lor. S-a utilizat lipază termostabilă din *Thermomyces lanuginosus* pentru hidroliza seului de vită, care reprezintă principala materie primă pentru hidroliza industrială a grăsimilor. Membrana microporoasă a fost de natură acrilică, cu pori de 0,2 μm și grosime în jur de 0,1 mm. După imobilizarea enzimei prin trecerea filtratului rezultat din cultură, seul topit (la 40-50°C) s-a pompat prin partea inferioară a reactorului, a trecut prin membrană având loc hidroliza, a urcat spre partea superioară și a ieșit din reactor împreună cu faza apoasă, formând un amestec care s-a separat ușor într-o pâlnie de separare. Conversia a variat de la câteva procente la 35%, depinzând de activitatea enzimei și debitul grăsimii. Trebuie menționat că activitatea enzimei imobilizate a fost de doar 0,4-0,9% din cea a enzimei libere, iar timpul de înjumătățire a activității a fost de 1-2 luni la 50°C. Membrana poate fi spălată și reactivată cu o nouă cantitate de enzimă. Se pare că reacția este controlată de difuzie, ceea ce explică randamentele destul de scăzute. Ulterior, conversia a fost mărită până la 83%, prin așezarea de trei reactoare în serie și mărirea numărului de straturi de membrană din fiecare reactor până la 30 (Taylor, Kurantz și Craig, 1992).

Hidroliza unturii de porc și a seului de vită a fost studiată într-un sistem de emulsie solidă, obținută prin amestecarea grăsimii cu soluția apoasă de lipază din *Candida rugosa* (numită anterior *Candida cylindracea*), fără a se folosi emulgator sau solvent organic. S-au obținut rezultate bune mai ales la hidroliza unturii de porc comestibile, unde după 24 h de reacție la 30°C și fără agitare continuă s-a atins un grad de hidroliză de până la 9 %, utilizând 0,5 g lipază la 1 kg de grăsime (De Renobales ș.a., 1992).

O posibilitate interesantă este hidroliza parțială a trigliceridelor pentru obținerea de mono- și digliceride. Această reacție a fost investigată pentru hidroliza trioleinei, găsindu-se că lipaza din pancreas de porc imobilizată pe Celite este cel mai eficient biocatalizator. După 5 ore de reacție s-a obținut o conversie în mono- și dioleină de 79% (Plou ș.a., 1996). Există câteva încercări de aplicare tehnologică a acestui procedeu, prezentate în brevete japoneze. Astfel, s-au obținut 2-monogliceride din trigliceride sub acțiunea lipazei pancreatice, respectiv 1,2-digliceride utilizând lipază din *Rhizopus delemar* (Werdelmann și Schmid, 1982).

Pe baza datelor de literatură existente, se poate trage concluzia că hidroliza trigliceridelor catalizată de lipaze, deși are loc în mod obișnuit cu randamente apropiate de 100 %, nu s-a putut transpune până în prezent în condiții exploatabile industrial folosind enzimă imobilizată și un sistem continuu de operare. Un alt obstacol este faptul că materia primă principală, seul de vită, se topește la o temperatură în jur de 45°C la care o serie de lipaze au stabilitate termică redusă.

Cu toate acestea, se poate presupune că în viitorul apropiat hidroliza clasică a grăsimilor și uleiurilor va fi înlocuită cu un procedeu enzimatic. După unele date, se pare că deja există instalații în Japonia care utilizează o lipază din *Candida cylindracea*

pentru hidroliza uleiului de in şi obţinerea unei pulberi de săpun (Kosugi, Suzuki şi Funada, 1988).

5.3.1.2. Reacţii de hidroliză enantioselectivă

Una din problemele cele mai dificile în domeniul compuşilor organici de sinteză fină este obţinerea compuşilor optic activi. Importanţa acestui domeniu va creşte pe măsură ce tot mai mulţi compuşi chirali vor deveni produse comerciale. Asemenea compuşi, la care doar unul din enantiomeri este activ din punct de vedere biologic, sunt aminoacizii, ß-blocanţii, piretroidele sintetice, feromonii, prostaglandinele, mentolul, etc. Enzimele sunt foarte potrivite pentru obţinerea de compuşi optic activi, fiind constituite doar din L-aminoacizi şi, drept consecinţă, centrii lor activi constituie un mediu asimetric care poate face uşor deosebire între enantiomeri. Din păcate, sinteza unor compuşi mai complicaţi pe cale enzimatică este adeseori dificilă, necesitând mai multe enzime şi cofactori, ceea ce duce la o serie de probleme legate de accesibilitatea acestora, coimobilizări, instabilitate, etc. Pe de altă parte, variantele de sinteză chimice nu sunt în general stereospecifice (cu excepţia unor cazuri spectaculoase). Se pare că cea mai avantajoasă metodă este utilizarea unor metode chimico-enzimatice combinate în care enzimele să fie folosite pentru obţinerea unor molecule mici, optic active, aşa numiţii "sintoni". Lipazele sunt potrivite pentru elaborarea unor asemenea procedee la scară industrială, fiind stabile, uşor de obţinut şi independente de cofactori. Cu ajutorul lor se pot obţine alcooli şi acizi optic activi, care sunt sintoni excelenţi, putând fi transformaţi uşor în alte clase de compuşi. Enantioselectivitatea reacţiilor catalizate de lipaze a fost remarcată destul de târziu, datorită dificultăţilor analitice de punere în evidenţă a obţinerii de 1,2- respectiv 2,3-digliceride optic active în cursul reacţiei tradiţionale catalizate de aceste enzime, hidroliza trigliceridelor. Acest lucru s-a realizat abia în ultimii ani, demonstrându-se că mai ales lipaza din *Pseudomonas* sp. manifestă şi o asemenea selectivitate (Uzawa ş.a, 1990; Uzawa ş.a., 1993).

Un parametru foarte important în reacţiile enantioselective este puritatea optică a produsului obţinut sau a substratului rămas nereacţionat. Deoarece de multe ori este posibilă obţinerea ambilor izomeri optici, însă unul dintre aceştia se găseşte în exces, puritatea optică este exprimată ca exces enantiomeric (care va fi notată în continuare e.e.). Acest exces enantiomeric se calculează pe baza conversiilor relative în cei doi enantiomeri. De exemplu, excesul enantiomeric pentru enantiomerul (*R*) al unui anumit produs va fi dat de relaţia:

$$\text{e.e.}_{\text{produs}} = \frac{\%\,\text{produs}(R) - \%\,\text{produs}(S)}{\%\,\text{produs}(R) + \%\,\text{produs}(S)} \qquad (5.64)$$

Deoarece de multe ori reacţiile enantioselective catalizate de enzime au loc prin rezoluţii optice bazate pe viteza diferită cu care reacţionează cei doi enantiomeri, a

fost necesară definirea unui parametru care să reflecte în mod mai sintetic enantioselectivitatea unei reacții enzimatice. Acest parametru a fost numit raport enantiomeric (sau coeficient enantiomeric), se notează cu E și se calculează pe baza excesului enantiomeric al produsului ($e.e._p$) sau substratului rămas nereacționat ($e.e._s$) și a valorii conversiei înregistrate (c). Relațiile de calcul pentru calculul raportului enantiomeric E în cazul produsului, respectiv al substratului nereacționat, sunt următoarele (Chen ș.a., 1982):

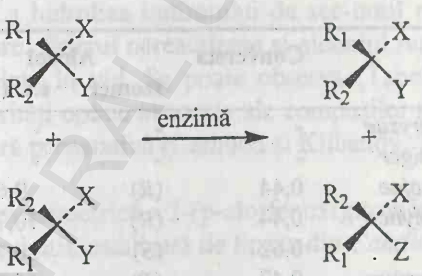
$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + e.e._p)]}{\ln[1 - c(1 - e.e._p)]} \qquad (5.65)$$

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 - e.e._s)]}{\ln[(1 - c)(1 + e.e._s)]} \qquad (5.66)$$

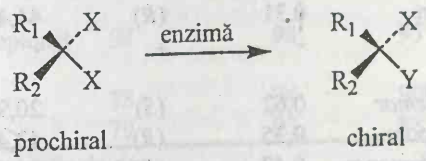
Acest raport enantiomeric reprezintă de fapt raportul dintre constantele de specificitate ale reacțiilor de formare a celor doi enantiomeri și nu depinde ce concentrația substratului.

Obținerea unor compuși optic activi utilizând enantioselectivitatea reacțiilor catalizate de hidrolaze se poate realiza prin următoarele trei modalități (Sheldon, 1993):

- rezoluția unor compuși racemici ce conțin una sau mai multe centre chirale



- formarea unor compuși optic activi din substraturi prochirale



- formarea unor compuși optic activi din compuși de tip "mezo"

Stereochimia reacţiilor de hidroliză ale esterilor şi de esterificare catalizate de hidrolaze relevă faptul că majoritatea enzimelor sunt (*R*)-specifice, aşa cum se arată în Figura 5.11, exemplificat pentru acetatul de α-metil-benzil. Aici mecanismul de acilare este ireversibil deoarece ca agent de acilare se foloseşte un ester enolic. O serie de enzime sunt însă (*S*)-specifice, aşa cum rezultă şi din Tabelul 5.7 (Schneider, 1995).

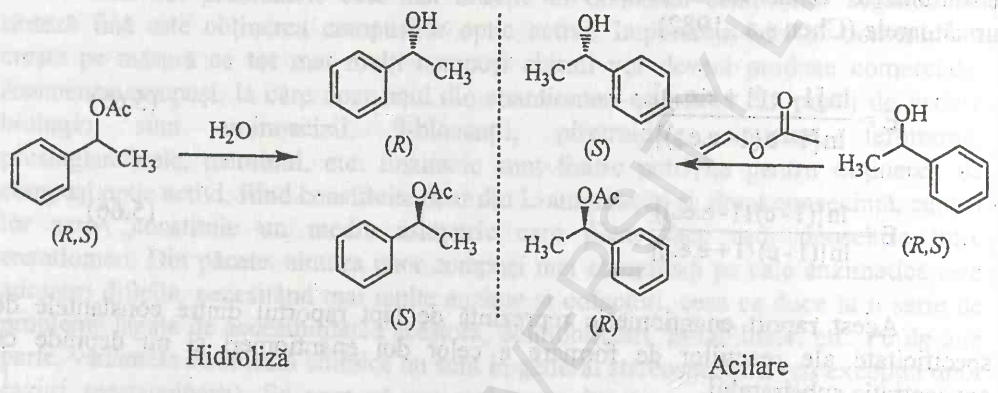


Figura 5.11. Stereochimia reacţiilor de hidroliză şi esterificare catalizate de hidrolaze

Tabelul 5.7. Evaluarea biocatalizatorilor pentru obţinere de compuşi optic activi prin reacţia de hidroliză asimetrică a butiratului de 1-clor-3-fenoxi-2-propanol, la pH 7,0

Tipul enzimei	Conversia	Alcool		Ester	
		Izomer	e.e. (%)	Izomer	e.e. (%)
lipază din *Aspergillus oryzae*	-	-	-	(±)	-
lipază din *Aspergillus niger*	-	-	-	(±)	-
lipază din *Aspergillus sojae*	0,44	(*R*)	9,6	(*S*)	24,7
lipază din *Candida lipolytica*	0,44	(*R*)	70,7	(*S*)	90,5
lipază din *Candida* sp.	0,62	(*S*)	20,7	(*R*)	12,7
lipază din *Chromobacterium viscosum*	0,47	(*R*)	66,9	(*S*)	75,6
lipază din *Humicola lanuginosa*	0,39	(*R*)	61,0	(*S*)	94,0
lipază din *Geothricum candidum*	0,44	(*R*)	48,2	(*S*)	60,2
lipază din *Mucor miehei*	0,31	(*R*)	44,4	(*S*)	98,0
lipază din *Penicillium roqueforti*	-	-	-	(±)	-
lipază din *Rhizopus delemar*	0,62	(*S*)	20,9	(*R*)	12,7
lipază din pancreas de porc	0,35	(*R*)	43,4	(*S*)	82,0
colinesterază din *Pseudomonas fluorescens*	0,47	(*R*)	24,6	(*S*)	27,6
lipază din *Pseudomonas* sp.	0,47	(*R*)	86,2	(*S*)	96,3
esterază din ficat de porc	0.90	(*S*)	14,0	(*R*)	1,5

În consecință, alegerea enzimei va trebui făcută în funcție de produsul a cărei obținere este dorită. De exemplu, pentru a obține izomerul (*R*) al alcoolului, se va face hidroliza unui ester racemic cu o enzimă (*R*)-specifică, sau acilarea alcoolului racemic cu o enzimă (*S*)-specifică.

Un studiu efectuat de Cambou și Klibanov a arătat că din punct de vedere al productivității, ușurinței de separare a produșilor și numărului de etape necesare, hidroliza asimetrică este cea mai bună pentru obținerea acizilor optic activi, în timp ce transesterificarea reprezintă varianta optimă de separare enantioselectivă a alcoolilor (Cambou și Klibanov, 1984). Pentru obținerea unui acid optic activ prin hidroliză asimetrică în prezența lipazei, atomul de carbon chiral trebuie să se găsească în restul acil al esterului, în timp ce pentru obținerea alcoolilor optic activi acesta se va găsi în restul alchil. S-a utilizat lipaza din *Candida cylindracea* pentru obținerea următorilor compuși optic activi: acid (*R*)-2-(p-clorfenoxi) propionic, ai cărui derivați se utilizează pe scară largă drept ierbicide și (*R*)-2-butanol, care este un sinton important pentru compuși chirali. Drept substrat s-au folosit soluții de ester racemic cu concentrația 2 M (esterul metilic al acidului 2-(p-clorfenoxi)-propionic, respectiv butiratul de sec-butil) în soluție tampon borat 0,5 mM de pH 8,0 conținând 3 mM $CaCl_2$ și 0,2 M NaCl. Reacția avut loc la 25°C, cu menținerea pH-ului la 8. Reacția de hidroliză a 2-(p-clorfenoxi)-propionatului de propil s-a oprit după 12 ore, când conversia a atins 50% fără a mai crește în continuare, chiar la adăugarea unei noi cantități de enzimă, ceea ce arată o enantiospecificitate absolută a reacției. Esterul nereacționat s-a extras cu eter. Acidul obținut s-a separat din faza apoasă prin acidulare la pH 1,0, extracție cu eter și evaporarea solventului. La hidroliza butiratului de sec-butil reacția a atins conversia finală de 50 % după 14 ore. Esterul nereacționat și alcoolul rezultat s-au extras cu eter și s-au separat prin distilare în vid. Se poate observa (Tabelul 5.8) că s-au obținut randamente ridicate și purități optice avansate ale compușilor sintetizați. Aceste reacții pot fi aplicate chiar la scară preparativă (Cambou și Klibanov, 1984).

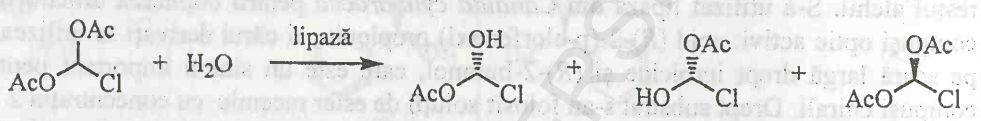
Tabelul 5.8. Hidroliza asimetrică a 2-(p-clorfenoxi)propionatului de metil și a butiratului de sec-butil, catalizată de lipaza din *Candida cylindracea*

Produsul obținut	**Randament (%)**	**Puritate[a]**	**e.e[b] (%)**	**Productivitate (g/l·h·g enzimă)**
Acid (*R*)-2-(p-clor-fenoxi)-propionic	85	97	96[c]	1,30
(*S*)-2-(p-clorfenoxi)-propionat de metil	93	98	95[d]	1,30
(*R*)-*sec*-butanol	78	94	90[c]	0,21
(*S*)-butirat de *sec*-butil	79	95	88[d]	0,41

[a] Determinată prin cromatografie de gaz.
[b] Exces enantiomeric
[c] Prin compararea valorilor rotațiilor optice determinate experimental cu cele din literatură.
[d] Pe baza purității optice a acidului rezultat prin hidroliza alcalină a esterului.

Un brevet francez (Rhône-Poulenc, 1979) prevede obținerea izomerului levogir al 3-clor-2-metil-1-propanolului prin hidroliza asimetrică a esterilor propionici sau butirici corespunzători. Reacția s-a efectuat la pH 8,5 menținut prin adăugare de soluție NaOH 1 N din timp în timp. După 16 ore la 20°C s-a obținut o conversie de aproximativ 25%. Faza organică s-a separat de cea apoasă prin centrifugare. Alcoolul optic activ s-a extras din faza apoasă alcalinizată cu cloroform și s-a distilat, obținând un produs al cărui conținut în izomer levogir a fost de 78%. 3-clor-2-metil-1-propanolul optic activ este un intermediar important în sinteza unor analgezice.

Hidroliza asimetrică a 1,2-diacetoxi-3-clorpropanului cu lipaze duce la obținerea unui amestec de (*R*)-1-acetoxi-3-clor-2-propanol și (*R*)-2-acetoxi-3-clor-1-propanol, alături de (*S*)-1,2-diacetoxi-3-clorpropan.



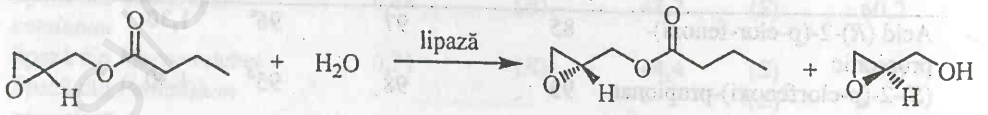
1,2-diacetoxi-3-clorpropan

(*R*)-1-acetoxi-3-clor-2-propanol

(*R*)-2-acetoxi-3-clor-1-propanol

Reacția se face la 25°C timp de 17 ore, obținându-se o conversie de aproximativ 75%. După extracție cu hexan și spălare pentru eliminarea alcoolilor formați, se obține (*S*)-esterul optic activ cu un randament de 20% și puritate optică de 90%. Acesta este un sinton important, fiind folosit mai departe pentru obținerea (*S*)-propranololului, unul din cei mai importanți ß-blocanți folosiți în tratamentul hipertensiunii (Iriuchijima și Kojima, 1982).

O altă categorie de compuși chirali care se pot obține prin hidroliză asimetrică sunt esterii epoxi-alcoolilor, de exemplu esterii glicidolului (Ladner și Whitesides, 1984). Aceștia sunt de asemenea sintoni chirali importanți pentru obținerea unor β-blocanți. De exemplu, prin hidroliza a 300 g butirat de glicidil racemic în 300 mL apă în prezența a 7,5 g lipază brută din pancreas de porc la pH 7,8 (menținut prin adăugare de NaOH), după 6 ore de reacție s-a atins o conversie de aproximativ 60%. După extracție cu clorură de metilen și distilare s-a obținut esterul optic activ, (*R*)-butiratul de glicidil, cu un randament de 98% și puritate optică de peste 92%.

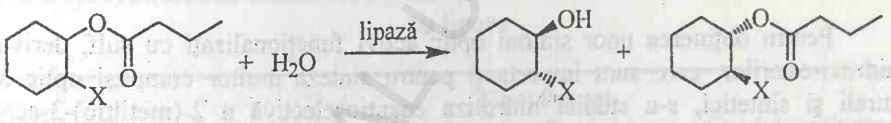


La hidroliza esterilor butilici ai 3-metoxi-1-(fenilmetoxi)-2-propanolului și 3-clor-1-(fenilmetoxi)-2-propanolului cu lipază din *Candida antarctica* s-a obținut enantioselectivitate ridicată doar în cazul în care mediul de reacție a conținut și un cosolvent organic, acetonă sau terț-butanol. Compușii optic activi obținuți astfel se pot

utiliza la sinteza fenilmetil-glicidil-eterilor optic activi, care sunt sintoni C_3 homochirali importanți (Hansen ș.a., 1995).

Foelsche ș.a. au studiat obținerea prin hidroliză asimetrică a unor 2-azido-alcooli aciclici utilizând enzime comerciale din *Candida cylindracea* și *Pseudomonas fluorescens*. Acești alcooli sunt precursori ai amino-alcoolilor optic activi, de mare importanță ca și sintoni chirali și produși de interes farmaceutic. S-au utilizat esterii butirici ai azido-alcoolilor. La soluția de lipază în soluție tampon fosfat 0,1 N, pH 6,5 s-a adăugat esterul azido-alcoolului. pH-ul s-a menținut tot timpul la 6,5 prin adăugare de NaOH 1 N. După un timp care s-a situat între 7-55 ore în funcție de natura substratului, când conversia a ajuns în jur de 30-40%, alcoolul optic activ și esterul nereacționat s-au separat prin cromatografie pe coloană, iar esterul s-a hidrolizat în continuare cu lipază, până la o conversie de aproximativ 30% (deci în total 60-70%). După separare în același mod, s-au obținut esterii azido-alcoolilor, optic activi, cu randamente de separare între 22-46% și exces enantiomeric de la 22 până peste 98% în mai multe cazuri (Foelsche ș.a., 1990).

În cursul experimentelor de obținere a amino-alcoolilor optic activi, același colectic a reușit și separarea de enantiomeri ai unor ciclohexanoli 2-substituiți, prin hidroliza esterilor butirici corespunzători. Plecând de la aceste rezultate s-a reușit extinderea metodei de hidroliză asimetrică cu lipaze pentru obținerea de ciclohexanoli substituiți optic activi și de a obține pe această cale noi sintoni chirali pentru compuși biologic activi. Are loc următoarea reacție (Hönig și Seufer-Wasserthal, 1990):



O serie din compușii menționați s-au obținut cu randamente bune și puricăți optice ridicate (Tabelul 5.9).

Kalaritis ș.a. au constatat că lipaza din *Pseudomonas fluorescens* manifestă specificitate pentru enantiomerii (*S*) ai mai multor esteri ai acidului hexanoic 2-substituiți. Reacția s-a făcut în mediu de soluție tampon la pH 7-8. Când conversia a atins 50% (după aproximativ 4 ore), esterii nereacționați s-au separat printr-o simplă extracție, cu un exces enantiomeric cuprins între 72-91%. Enantiomerii nedoriți s-au racemizat foarte simplu prin agitarea soluțiilor esterice ale acestora cu hidrură de sodiu în cantități catalitice, peste noapte, la temperatura ambiantă. Viteza de hidroliză în cazul acestor reacții a fost mare, cea mai rapidă fiind hidroliza 2-fluoro-hexanoatului de etil. Procesul permite utilizarea unor concentrații mari de substrat și a unui raport substrat/enzimă ridicat (500 g/L și respectiv 4000 g/g în cazul hidrolizei 2-fluoro-hexanoatului de etil), ceea ce alături de costul redus al enzimei, recomandă acest proces pentru aplicare industrială. (*R*)- și (*S*)-2-fluorohexanoații de etil sunt intermediari importanți în sinteza 16-fluoroprostaglandinelor (antihipertensive) și 16-fluoroprostaciclinelor (vasodilatatoare) (Kalaritis ș.a., 1990).

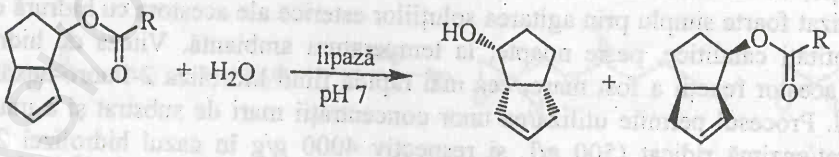
Tabelul 5.9. Obținerea enantioselectivă a esterilor 2-ciclohexanolilor substituiți prin hidroliză asimetrică cu lipaze

Substituent X	Enzimă	Timp (h)	Conversie (%)	Rand.[c] (%)	Izomer	e.e. (%)
OME	CCL[a]	5	60	32	(*S,S*)	93
OMe	PSL[b]	28	53	44	(*S,S*)	>98
OEt	CCL	5	61	32	(*S,S*)	40
OEt	PSL	28	52	46	(*S,S*)	>98
Cl	CCL	4,5	60	32	(*S,S*)	90
Cl	PSL	16	50	46	(*S,S*)	>98
Et	CCL	35	57	38	(*S,S*)	96
Et	PSL	100	52	42	(*S,S*)	94
C≡CH	CCL	7	63	32	(*S,R*)	94
C≡CH	PSL	96	50	42	(*S,R*)	>98
N≡C	CCL	4	66	28	(*S,S*)	>98
N≡C	PSL	6	58	37	(*S,S*)	95
NMe_2	CCL	48	42	52	n.d.	<2
NMe_2	PSL	30	40	55	n.d.	<2

[a] lipază din *Candida cylindracea*
[b] lipază din *Pseudomonas* sp.
[c] Randamentul de izolare al produsului

Pentru obținerea unor sintoni optic activi funcționalizați cu sulf, derivați ai 3-hidroxi-esterilor, care sunt importanți pentru sinteza multor compuși optic activi naturali și sintetici, s-a studiat hidroliza enantioselectivă a 2-(metiltio)-3-acetoxi-esterilor cu lipază din *Aspergillus* sp. (Itoh ș.a., 1991). Reacția s-a făcut în tampon fosfat 0,1 M de pH 7,2 la temperatura camerei. S-a constatat că este hidrolizat doar diastereomerul *anti*, acesta obținându-se după 12 ore de reacție cu un exces enantiomeric de 88%.

O altă utilizare a hidrolizei enantioselective cu ajutorul lipazelor o constituie obținerea de (+)-*endo*-(1*R*,2*R*,5*R*)-biciclo-[3,3,0]oct-7-en-2-ol, prin hidroliza esterului corespunzător (Klempier, Faber și Griengl, 1989):

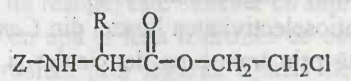


endo-(1*R*,2*R*,5*R*)-biciclo-[3,3,0]oct-7-en-2-ol

Reacția s-a făcut în soluție tampon fosfat 0,1 N de pH 7,0, cu adăugare de NaOH pentru menținerea pH-ului. Timpul de reacție a fost între 1-8 ore. S-au folosit

mai multe feluri de lipaze: din *Candida cylindracea*, pancreas de porc, *Pseudomonas fluorescens* şi *Mucor miehei*. Reacţia a decurs cel mai rapid, cu enantioselectivitate şi conversie practic totale cu lipaza din *Pseudomonas*. Aceşti compuşi servesc ca materie primă pentru sinteza unor sesquiterpene ciclopentanoidice.

Lipazele hidrolizează enantioselectiv şi unii esteri ai derivaţilor N-benziloxicarbonilici ai aminoacizilor, având formula generală:



Z = benziloxicarbonil

Condiţiile de reacţie au fost, pentru lipaza din *Aspergillus niger*: temperatură 25°C, pH 7,0 (tampon fosfat 0,2 M) menţinut în timpul hidrolizei prin adăugare de NaOH 0,5 M. Timpul de reacţie a diferit mult în funcţie de natura enzimei utilizate şi a substituentului R. S-au testat trei tipuri de lipaze (Tabelul 5.10). Enantioselectivitatea cea mai pronunţată s-a înregistrat în cazul lipazei din *Aspergillus niger* (Miyazawa ş.a., 1988). Trebuie remarcat că în toate cazurile enantiomerul L fost hidrolizat preferenţial. Aminoacizii optic activi obţinuţi se pot folosi drept sintoni pentru sinteza unor peptide analoage cu cele biologic active.

Tabelul 5.10. Hidroliza asimetrică a derivaţilor N-benziloxicarbonicili ai aminoacizilor cu lipaze.

Substituent	Tipul lipazei					
	Aspergillus niger		*Pseudomonas fluorescens*		*Candida cylindracea*	
	conversie	e.e.(%)	conversie	e.e. (%)	conversie	e.e. (%)
metil	36	89	46	16	38	7
etil	40	96	49	52	36	7
n-propil	27	86	43	58		
n-butil	32	85	52	60	42	30
n-pentil	44	95	25	80	27	60
n-hexil	31	94	47	87		
i-propil	14	92	8	53		
2-propenil	34	86	40	52	31	27
benzil	32	84	12	57	35	63

Holmberg ş.a. au stabilit că utilizarea unui ester bichiral determină o amplificare a enantioselectivităţii hidrolizei enzimatice, prin combinarea diastereoselectivităţii chimice cu enantio- şi diastereoselectivitatea enzimatică. Acest lucru s-a demonstrat la obţinerea unui alcool secundar optic activ, prin hidroliza 2-clorpropionatului de 1-feniletil (Holmberg ş.a., 1991).

În majoritatea cazurilor studiate în literatură, compuşii supuşi acţiunii enzimatice au centrul chiral sau prochiral situat la una sau cel mult două legături de gruparea carbonil reactivă. S-a demonstrat însă, pe exemplul unor ditioacetal-esteri racemici, că enantioselectivitatea se manifestă până la o distanţă de cinci legături între centrul chiral sau prochiral şi gruparea carbonil esterică. Această selectivitate nu scade obligatoriu cu creşterea distanţei, fiind mai bună în cazul existenţei unei distanţe de 4 legături, decât la 3 şi 5 legături (Hughes ş.a., 1991).

S-a stabilit că enantioselectivitatea lipazei din *Candida cylindracea* se măreşte dacă enzima este purificată prin tratare cu deoxicolat şi solvent organic (eter-etanol 1:1). Se consideră că aceasta este rezultatul modificării necovalente a proteinei enzimatice (Wu, Guo şi Sih, 1990).

Reacţiile de hidroliză enantioselectivă catalizate de lipaze vor dobândi o importanţă practică deosebită în viitorul apropiat. Interesul deosebit al cercetătorilor din majoritatea ţărilor avansate pentru a obţine pe această cale sintoni pentru fabricarea unor compuşi optic activi cu utilizări farmaceutice şi biomedicale reprezintă o garanţie a acestei presupuneri. Simplitatea procedeului, costul redus, puritatea optică avansată a produşilor sunt principalele avantaje care vor impune utilizarea pe scară largă a reacţiilor de hidroliză asimetrică enzimatică.

5.3.2. Reacţii de esterificare şi transesterificare

5.3.2.1. Sinteze de esteri prin reacţii de esterificare directă

Posibilitatea utilizării lipazelor drept catalizatori în reacţii de esterificare a fost adusă în actualitate în 1977 de Tsujisaka ş.a. care au arătat că în funcţie de specificitatea enzimei folosite, în reacţia dintre glicerină şi acizi graşi se obţin produse diferite (Tsujisaka, Okumura şi Iwai, 1977).

Prin reacţii de esterificare dintre acizii graşi şi diverşi alcooli, catalizate de lipaze, se pot obţine o serie de produse utilizate mai ales în industria alimentară:

- mono- şi diesteri ai glicerinei cu lipaze 1,3-specifice (emulgatori)
- esteri ai alcoolilor primari şi secundari (plastifianţi, aromatizanţi)
- poliesteri pe bază de compuşi polihidroxilici ca glucoză, fructoză, etc. (biosurfactanţi).

Lipazele utilizate trebuie să aibă în primul rând o specificitate corespunzătoare, pentru a produce produsul dorit la un cost rezonabil. Această specificitate de substrat se poate manifesta atât în raport cu acidul cât şi cu alcoolul utilizat. De asemenea, lipazele trebuie să fie active şi stabile în condiţiile de reacţie utilizate.

Reacţiile de esterificare enzimatice au loc în general la temperaturi de până la 70°C în prezenţa unei cantităţi reduse de apă. S-a demonstrat că lipaza pancreatică îşi menţine activitatea chiar la o concentraţie de apă de numai 0,015% şi temperatură de aproape 100°C (Zaks şi Klibanov, 1984). O serie de alte lipaze, mai ales în stare imobilizată, sunt active şi rezistente la inactivare termică în condiţiile unui conţinut redus de apă, dar ele sunt susceptibile la otrăvire din cauza unor impurităţi prezente în

cantități mici în materiile prime. Dacă este posibil, pentru utilizări comerciale trebuie selecționate lipaze rezistente la acest tip de otrăvire. Sistemele de reacție pentru esterificare (ca și pentru transesterificare, de altfel) constau din lipază și o cantitate mică de apă dispersate într-o fază organică ce este alcătuită din reactanți și, dacă este cazul, dintr-un solvent organic nemiscibil cu apa. Cantitatea mică de apă din sistem se repartizează între catalizator și faza organică. Lipazele catalizează reacțiile la interfețe și pentru a obține viteze mari de reacție, este necesar ca suprafața acestei interfețe între faza de reactanți nemiscibilă cu apa și faza hidrofilă ce conține lipaza să fie cât mai mare. Acest lucru se poate realiza prin legarea lipazei de suprafața unui suport cu particule macroporoase. Catalizatorii cei mai activi s-au obținut prin adsorbția lipazei pe particule de polimeri macroporoși organici sau anorganici. Pentru prepararea catalizatorilor se poate utiliza adsorbția prin interacțiune ionică sau hidrofobă. O altă metodă, des utilizată, constă în legarea pe suprafața unor particule anorganice poroase (cum ar fi pământurile de diatomee calcinate) a unui strat de lipază brută. Legarea se poate realiza prin precipitatea cu un solvent a proteinei în prezența particulei respective, sau printr-o uscare înceată, controlată, a unui amestec de particule în exces cu o soluție concentrată de lipază. Activitatea nu este singurul factor de care trebuie să se țină cont la alegerea unui suport pentru imobilizarea lipazei. Acesta trebuie, dacă este posibil, să contribuie la stabilizarea enzimei în reactorul de sinteză și să aibă caracteristici mecanice potrivite pentru a putea fi folosită (Macrae, 1989). În ultima perioadă au fost propuse o serie de variante de imobilizare a lipazelor prin entrapare în silicageluri hidrofobe (Reetz, Zonta, și Simpelkamp, 1996, Gill, Pastor și Ballesteros, 1999; Pierre, 2004). Asemenea biocatalizatori au fost testați cu succes în reacții de esterificare și transesterificare.

În general vitezele de reacție în cazul esterificărilor catalizate de lipaze sunt suficient de mari pentru a permite utilizarea lor la obținerea la scară industrială a esterilor acizilor grași. Așa cum s-a arătat, adeseori reactanții lichizi îndeplinesc și rolul de mediu de reacție. Însă, în mod frecvent, reactanții sunt fie solizi la temperatura de reacție, fie nemiscibili unul cu altul. În aceste cazuri este necesară utilizarea unui solvent pentru a obține un mediu de reacție omogen. Se pot utiliza solvenți nepolari, nemiscibili cu apa, cum ar fi hexan, eter de petrol, toluen, tricloretan. Utilizarea unor solvenți miscibili cu apa ca acetonă, tetrahidrofuran sau dimetilformamidă în general duce la viteze de reacție foarte mici. Se crede că acești solvenți inactivează catalizatorul prin dehidratarea excesivă a enzimei (Macrae, 1989). În situațiile când reactanții sunt lichide miscibile sau se utilizează un solvent organic pentru a omogeniza mediul de reacție, esterificarea poate fi realizată cu ajutorul lipazelor imobilizate într-un reactor cu pat fix de catalizator. Dacă reactanții sunt nemiscibili sau se utilizează soluții apoase de lipază, deci apar sisteme de reacție bifazice, reacțiile se pot face în reactoare cu membrană (Valivety, Halling și Macrae, 1992).

O posibilitate investigată intens în ultima perioadă este utilizarea de CO_2 supercritic drept mediu de reacție pentru reacțiile de esterificare și transesterificare catalizate de lipaze. S-a constatat că enzima își păstrează activitatea în mediul de fluid supercritic și acest mediu prezintă o serie de avantaje față de solvenții organici

obişnuiţi: este ieftin, netoxic, neinflamabil şi recuperarea produşilor se poate realiza uşor la terminarea reacţiei (Dumont ş.a., 1992; Marty ş.a., 1992; Ikushima ş.a., 1996; Capewell ş.a., 1996). Este posibilă chiar fracţionarea acestor produşi prin extracţie cu fluide supercritice (Chrisocou şi Schaber, 1996), iar în unele cazuri enantioselectivitatea enzimei s-a dovedit a fi mai mare decât în solvenţi organici. Lipaza din pancreas de porc, care în mod obişnuit nu este enantioselectivă în reacţia de hidroliză a trigliceridelor (Uzawa ş.a., 1993), în condiţii supercritice dobândeşte această specificitate (Glowacz ş.a., 1996). Principalele probleme legate de utilizarea fluidelor supercritice sunt cele de ordin tehnologic şi preţul ridicat al instalaţiilor respective.

În prezent se recunoaşte faptul că prezenţa apei, în mod uzual în cantităţi foarte mici, este necesară în sistemele de reacţie de esterificare şi transesterificare. Foarte mare importanţă are conţinutul de apă din sistemul de reacţie, respectiv activitatea termodinamică a apei, care trebuie menţinută la un nivel controlat stabilit pentru fiecare asemenea sistem (Halling, 1989; Khan, Halling şi Bell, 1990; Valivety ş.a., 1992; May 1992; Ferreira-Dias şi de Fonseca, 1995).

Această apă poate avea două roluri. În primul rând este necesară enzimei pentru menţinerea stării active hidratate, iar în al doilea rând este un reactant pentru reacţia inversă, de hidroliză, jucând un rol important în stabilirea echilibrului reacţiei. În această ordine de idei, trebuie luată în considerare şi apa rezultată în reacţie, care determină scăderea randamentului în ester. Pentru a obţine randamente mari este necesar ca reacţia să fie dusă până la capăt, fie prin utilizarea unui exces însemnat al unuia din reactanţi, fie prin îndepărtarea unuia din produşii formaţi. Cea din urmă soluţie este preferată pentru sintezele la scară industrială. Îndepărtarea apei se poate face prin distilare în vid, distilare heteroazeotropă, absorbţie pe medii care leagă apa, prin trecerea unui curent de gaz uscat în partea superioară a reactorului sau prin utilizarea unei suprafeţe reci în partea superioară pentru a elimina apa sub formă de gheaţă. O posibilitate interesantă este introducerea în sistemul de reacţie a unei perechi de hidraţi de săruri solide, de exemplu Na_2SO_4 anhidru şi decahidrat, pentru a tampona activitatea apei la o anumită valoare (Kvittingen ş.a., 1992; Sjursnes ş.a., 1992).

Sinteza esterilor glicerinei cu lipaze

Lipazele pot fi utilizate la obţinerea atât a monogliceridelor (Bornscheuer, 1995), digliceridelor (Weber şi Mukherjee, 2004), cât şi a trigliceridelor (Lortie, Trani şi Ergan, 1992).

Sinteza esterilor glicerinei prezintă un interes comercial considerabil, datorită utilizării acestor compuşi pe scară largă ca emulgatori în industria alimentară. Aşa cum se cunoaşte, sinteza chimică a emulgatorilor are anumite inconveniente legate de închiderea la culoare a produşilor datorită condiţiilor de temperatură, ceea ce necesită purificarea lor ulterioară.

Obţinerea mono- şi digliceridelor se poate face în principiu pe trei căi:

a. esterificarea directă a glicerinei cu acizii graşi în prezenţă de catalizatori, la temperaturi înalte. Acest procedeu este industrializat într-o serie de ţări. Procedeul enzimatic reprezintă o alternativă la cel clasic, ţinând cont de avantajele cunoscute pe care le prezintă.

b. reacţia dintre trigliceride şi glicerină (glicerioliză), în prezenţa unor catalizatori alcalini, care duce la un amestec de mono-, di- şi trigliceride. Concentraţia monogliceridelor poate fi mărită prin distilare (Gunstone, 1990).

c. hidroliza parţială a trigliceridelor. Procedeul clasic de hidroliză a trigliceridelor în mediu alcalin la temperatură şi presiune înaltă duce la obţinere de glicerină şi acizi graşi (săpunuri). În cazul utilizării lipazelor drept catalizatori, acest proces poate fi oprit la stadiul de mono- sau digliceridă, datorită selectivităţii lipazei, aşa cum s-a arătat anterior.

Obţinerea de esteri ai glicerinei cu acizii graşi s-a efectuat prin esterificare directă, în sisteme bifazice (Tsujisaka, Okumura şi Iwai, 1977). Reactanţii lichizi s-au amestecat direct cu o soluţie apoasă de lipază. Acizii graşi fiind nemiscibili cu apa, pentru a obţine o viteză de reacţie corespunzătoare a fost esenţială realizarea unei interfeţe cât mai mari între cele două faze printr-o agitare intensă. Reacţia fiind reversibilă, randamentul în ester depinde de conţinutul în apă al sistemului. Amestecul de reacţie a constat din 4 mL glicerină, 1 mL apă, 0,1 mL soluţie de lipază (conţinând 30 unităţi enzimatice) şi 0,1 mL acid gras. S-a agitat acest amestec timp de 16 ore la temperatura de 30°C cu o viteză de 200 rotaţii/minut. S-au obţinut randamente de esterificare destul de bune, mai ales cu lipaza din *Aspergillus niger* (Tabelul 5.11).

Tabelul 5.11. Sinteze de esteri ai glicerinei cu acizi monocarboxilici catalizate de lipaze microbiene

Denumirea acidului	Tipul lipazei			
	Aspergillus niger	*Rhizopus delemar*	*Geothricum candidum*	*Penicillium cyclopium*
	Grad de esterificare (%)			
acid acetic	24,9	0	0	0
acid butiric	73,5	4,1	0	0
acid caprilic	75,4	67,7	0	32,0
acid lauric	71,9	31,8	13,9	87,1
acid palmitic	13,8	38,0	4,6	9,0
acid stearic	10,5	2,0	5,3	5,9
acid oleic	75,3	70,4	66,4	69,0
acid ricinoleic	60,0	57,0	24,3	68,4

Randamentele scăzute în cazul acizilor palmitic şi stearic se datorau faptului că aceştia sunt solizi la temperatura de reacţie. Analiza produşilor de reacţie prin cromatografie în strat subţire a arătat prezenţa atât a mono-, di-, cât şi a trigliceridelor corespunzătoare.

Prin folosirea lipazei pancreatice drept catalizator în reacția de esterificare a acidului oleic cu glicerina în mediu apos emulsionat, s-a obținut de asemenea un produs de reacție ce conținea toate tipurile de gliceride, conținutul de monogliceridă ajungând până la 50% (Bacaloglu ş.a., 1985).

S-au realizat şi sisteme bifazice în care substratul insolubil în apă era dizolvat într-un solvent nemiscibil cu apa. Uneori însă la asemenea sisteme a apărut problema denaturării enzimei din cauza solventului (Nagao şi Kito, 1990).

Un asemenea sistem de reacție a fost constituit din 10 g acizi graşi (fie amestec de acizi C_{12}-C_{18}, fie amestec de acid palmitic şi stearic în proporții egale) dizolvați în 500 mL solvent organic (ciclohexan sau heptan), 250 g glicerină conținând 5% apă şi 1g lipază din *Rhizopus delemar* (Pina şi Graille, 1983). Reacția s-a făcut prin amestecare energică într-un reactor de 2 L la 37°C timp de 4 ore. Randamentele obținute au fost scăzute, între 17 şi 21%. Produsele de reacție au fost constituite în majoritate din 1,3-digliceride, alături de 1,2-digliceride, monogliceride şi cantități foarte mici de trigliceride.

Aşa cum se observă, realizarea reacțiilor de esterificare în sisteme bifazice este legată de o serie de inconveniente care fac dificilă aplicarea unor asemenea procese la scară industrială. Pentru depăşirea lor au fost concepute bioreactoare cu membrană.

Un asemenea bioreactor cu flux orizontal ce operează în regim continuu constă din trei compartimente distincte, separate între ele de câte o membrană microporoasă hidrofobă din polipropilenă (Yamane ş.a., 1984). Prin compartimentul central este pompată o soluție de lipază (de ex. din *Chromobacterium viscosum*) în glicerină, în timp ce prin cele două compartimente exterioare se pompează acidul gras. Lipaza este solubilizată într-o cantitate mică de apă, concentrația inițială a apei în sistemul glicerină-lipază fiind de 3%. Datorită naturii hidrofobe a membranei, acidul gras poate difuza rapid prin micropori spre faza hidrofilă ce conține lipaza şi glicerina, reacția de esterificare având loc la interfața membranei. Gliceridele formate difuzează înapoi în faza lipofilă de acid gras, în timp ce celălalt produs format, apa, rămâne în faza hidrofilă. Îndepărtarea apei formate în reacție din sistem s-a realizat prin intercalarea pe traseul de recirculare a unei coloane cu site moleculare. Temperatura s-a menținut la 40°C. Activitatea inițială a enzimelor a fost de 6.000 unități/ml soluție de glicerină.

În aceste condiții au fost încercate mai multe lipaze microbiene pentru esterificarea acidului oleic cu glicerină (Tabelul 5.12). Analiza produşilor de reacție a arătat că esterii formați sunt constituiți din cantități aproximativ egale de mono- şi digliceride, în timp ce cantitățile de trigliceride formate sunt mici sau neglijabile.

Tabelul 5.12. Sinteze de esteri ai glicerinei cu acid oleic catalizate de lipaze microbiene într-un reactor cu membrană

Proveniența lipazei	Activitatea (unități/mg)	Conversia (%)
Candida cylindracea	290	3,8
Chromobacterium viscosum	56	78
Mucor miehei	35	74
Pseudomonas fluorescens	200	55
Rhizopus delemar	350	32

Au fost făcute o serie de încercări de sinteză ale unor gliceride utilizând lipaze imobilizate accesibile comercial, cum ar fi Lipase G (de la firma Amano) provenită din *Pseudomonas* sp. şi având specificitate pentru monogliceride, sau Lipozyme (de la compania Novo) din *Mucor miehei*, care este 1,3-specifică (Valivety, Halling şi Macrae, 1992). Astfel reacția dintre acid oleic şi glicerină, catalizată de Lipase G, duce aproape exclusiv la formare numai de monogliceride, însă nu s-au obținut decât conversii mici. Lipozyme catalizează reacția dintre acid oleic şi glicerină, deşi cu viteze mai mici decât Lipase G, obținându-se gliceride în ordinea specificității:

Digliceride > Monogliceride > Trigliceride.

Randamente mai ridicate în gliceride s-au obținut utilizând site moleculare pentru îndepărtarea apei formate (Valivety, Halling şi Macrae, 1992). S-a demonstrat că formarea trioleinei în acestă reacție este datorată izomerizării 1,3-dioleinei şi esterificării grupei hidroxil primare devenite libere.

O altă variantă de sinteză cercetată foarte mult în ultima perioadă pentru reacțiile de esterificare catalizate de lipaze este cea care utilizează miceliile inverse ca medii de reacție. Acestea sunt stabile din punct de vedere termodinamic, omogene şi au mari suprafețe ale interfeței accesibile pentru recțiile enzimatice. Aceste sisteme nu necesită agitare mecanică sau emulsifiere. Echilibrul chimic poate fi deplasat în direcția formării esterului prin controlul asupra conținutului de apă al sistemului. Enzima este protejată față de denaturarea produsă de solvent datorită stratului de surfactant.

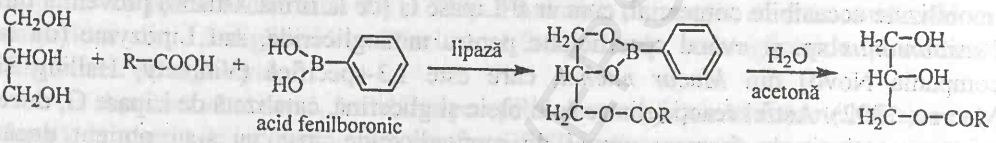
Pentru obținerea miceliilor inverse se utilizează surfactanți sintetici ca sulfosuccinatul de bis(2-etilhexil) sodiu (AOT) sau fosfolipide obținute din surse naturale, cum ar fi fosfatidilcolina şi fosfatidiletanolamina. Într-un astfel de sistem ce utiliza fosfatidilcolină s-a observat formarea 1-monogliceridelor şi 1,3-digliceridelor din glicerină şi acizi graşi, în timp ce 1,2-digliceride şi trigliceride nu au fost sintetizate. Acest lucru este datorat lipazei din *Rhizopus delemar* utilizate, care este 1,3-specifică. Se consideră că prin utilizarea unei lipaze nespecifice s-ar putea sintetiza în acest mod şi o serie de trigliceride (Morita ş.a., 1984).

Sinteza 1-monogliceridelor a fost realizată în micelii inverse de tip apă/AOT/izooctan cu lipază din *Rhizopus delemar*. S-a demonstrat că reacțiile s-au oprit la atingerea echilibrului cinetic, cu excepția unor rare cazuri când se produce dezactivarea enzimei. Conversiile maxime în monogliceride care s-au obținut au fost de

50-60%, în timp ce cantitatea de digliceride sintetizată în condițiile respective a fost scăzută. Specificitatea față de acizii grași, exprimată prin viteza inițială a reacției, a fost: acid oleic > acid caprilic > acid miristic > acid lauric > acid palmitic = acid stearic (Hayes și Gulari, 1991).

Pentru sinteza monogliceridelor de puritate înaltă a fost propusă și o metodă combinată, chimică și enzimatică. Acetalul corespunzător, sintetizat pe cale chimică din glicerină și acetonă, s-a esterificat cu un acid gras în prezența lipazei rezultând acetal-esterul acidului gras respectiv, care prin hidroliză a dus la obținerea monogliceridei în stare pură (Nagao și Kito, 1990).

O altă posibilitate de a obține monogliceride este utilizarea acidului fenilboronic drept agent de protecție și solubilizare a glicerinei (Papendorf ș.a., 1995). S-a utilizat Lipozyme, iar ca solvent n-hexanul.



Reacția a avut loc în două etape. În prima s-a lucrat la 60°C, timp de 3 ore, iar hidroliza esterului fenilboronic s-a făcut prin fierbere timp de 30 de minute în amestec acetonă/apă în raport 2/3. S-au obținut monogliceride ai unor hidroxiacizi grași cu randamente de până la 80%, cele mai bune rezultate fiind înregistrate în cazul acidului 12-hidroxi-octadecanoic.

Sinteze de esteri ai alcoolilor monohidroxilici primari și secundari

Reacțiile de esterificare catalizate de lipaze pot fi utilizate și pentru a obține o serie de alți esteri decât gliceridele. Problemele generale ale acestori sinteze sunt aceleași ca în cazul sintezei esterilor glicerinei cu acizii grași, deci și variantele de sinteză utilizate sunt asemănătoare.

Esterii acizilor carboxilici sunt componente importante ale aromelor naturale utilizate în industria alimentară. De exemplu, butiratul de etil și acetatul de izoamil au fost găsiți în aromele de căpșuni și respectiv de banane. Acești compuși sunt sintetizați în mod uzual prin metode chimice, însă procedeele enzimatice devin din ce în ce mai atrăgătoare (Langrand, Triantaphylides și Baratti, 1988).

O serie de esteri ai alcoolilor primari și secundari cu catenă scurtă, medie sau lungă au fost obținuți cu ajutorul lipazelor.

Primele experimente menționate în literatura de specialitate au fost efectuate în sisteme bifazice, conținând 0,2 mL alcool, 0,1 mL acid oleic, 0,5 mL soluție de cazeină 1% (emulgator) și 0,5 mL soluție de lipază microbiană (conținând 30 unități enzimatice). Reacțiile s-au efectuat la 30°C timp de 16 ore, prin agitare energică la 200 rotații/minut. S-au obținut esteri ai alcoolilor primari cu randamente în general ridicate, indiferent de proveniența enzimei folosite. Excepție a făcut doar lipaza din *Aspergillus*

niger, în cazul alcoolilor cu catene mai lungi decât C_4. Esterii alcoolilor secundari au fost sintetizați însă numai de lipaza din *Geothricum candidum* (Tabelul 5.13) (Okumura, Iwai şi Tsujisaka, 1979).

Tabelul 5.13. Sinteze de esteri ai acidului oleic cu alcooli primari şi secundari

Denumirea alcoolului	Tipul lipazei			
	Aspergillus niger	*Rhizopus delemar*	*Geothricum candidum*	*Penicillium cyclopium*
	Grad de esterificare (%)			
metanol	17	55	62	40
etanol	19	65	56	18
1-propanol	42	81	62	39
1-butanol	56	85	31	40
i-butanol	37	85	20	64
1-hexanol	7	56	29	61
1-octanol	10	86	59	57
1-decanol	9	68	72	76
alcool benzilic	9	14	3	32
2-propanol	0	0	32	1
2-butanol	0	0	38	1
2-pentanol	0	0	35	1

Alte cercetări pentru obținerea de esteri în sisteme bifazice conținând apă au avut drept scop sintetizarea de esteri ai acidului 2-metilpentanoic. Aceştia se disting prin mirosuri vegetale (coacăze negre, flori de soc) şi au o serie de alte proprietăți care îi fac utilizabili ca odorizanți. Cele mai bune rezultate s-au obținut la esterificarea cu alcool prenilic ($HO\text{-}CH_2\text{-}CH{=}C(CH_3)\text{-}CH_3$), în prezența lipazei din *Candida cylindracea*. După 40 de ore la temperatura de 30°C s-a obținut un randament de 98% în ester (Lazar, 1985).

O serie de esteri ai acizilor şi alcoolilor cu catenă lungă s-au sintetizat cu randamente în jur de 80 % tot în sisteme bifazice, dar conținând un solvent organic (Tabelul 5.14). Amestecul de reacție a fost constituit din câte 200 mg alcool şi acid, 5 mg lipază în 0,5 mL soluție tampon acetat 0,05M de pH 5,6 şi 4 mL n-hexan. Esterificarea s-a făcut la 30°C, timp de 16 ore, sub agitare (Lazar, 1985).

Tabelul 5.14. Sinteze de esteri cu lipaze în sisteme bifazice apă-solvenți organici

Denumirea alcoolului	Denumirea acidului	Proveniența lipazei	Grad de esterificare (%)
alcool palmitic	acid palmitic	*Pseudomonas* sp.	87
alcool oleic	acid stearic	*Mucor miehei*	80
alcool oleic	acid oleic	*Geothricum candidum*	80

Un progres important în direcția aplicării industriale a reacțiilor de esterificare catalizate de lipaze a înregistrat firma Novo prin utilizarea unei enzime imobilizate. Catalizatorul folosit a fost Lipozyme Novo care este lipază din *Mucor miehei* imobilizată pe Duolite ES 568. S-a observat că în prezența acesteia esterificarea acidului oleic cu octanolul este destul de rapidă, viteza de reacție în cazul unui amestec echimolar la temperatura de 60°C fiind de 1,27 μmoli/min/g catalizator, ceea ce reprezintă 5-10% din viteza de hidroliză a trioleinei cu aceeași cantitate de enzimă liberă la 40°C. La sinteza miristatului de miristil, utilizând amestecuri echimolare de alcool miristic și acid miristic, la 70°C și presiune atmosferică reacția s-a oprit la un randament în ester de 85% din cauza acumulării apei în sistemul de reacție. Dacă însă s-a îndepărtat apa prin distilare în vid, randamentul a crescut la 99%. Catalizatorul s-a dovedit a fi stabil în condițiile existente în reactoarele cu amestecare și s-a reutilizat succesiv pentru reacțiile de esterificare, productivitatea fiind de cel puțin 1,2 t ester la 1 kg catalizator.

Oleatul de n-butil a fost de asemenea sintetizat prin simpla amestecare a materiilor prime cu enzima și menținere sub agitare la 37°C. Cu lipază din *Chromobacterium viscosum* (conținând 5,9% apă), fără adăugare de apă sau solvent organic, s-a obținut după 12 ore un randament de 98% față de acidul oleic (Linko ș.a., 1992).

Această tehnologie este considerată corespunzătoare pentru a obține o largă varietate de esteri pornind de la acizi grași și alcooli primari și secundari, cu condiția ca materiile prime să fie miscibile între ele. S-au obținut randamente ridicate și produși de o excelentă calitate. Totuși, din cauza prețului ridicat al enzimei imobilizate, se consideră că aplicarea industrială a acestei tehnologii se va face numai pentru esterii cu valoare comercială ridicată (Macrae, 1989).

O altă variantă de sinteză este utilizarea de solvenți organici în condiții aproape anhidre, care are o serie de avantaje ce au fost prezentate anterior. Printr-o alegere potrivită a solventului se poate realiza în unele cazuri omogenitatea sistemului de reacție, chiar dacă reactanții ca atare sunt nemiscibili, eliminând problemele datorate transferului de masă defectuos în sistemele multifazice. Alegerea solventului este însă de multe ori dificilă, întrucât natura lui influențează foarte mult reacția. Astfel, la esterificarea acidului butiric cu heptanolul în diverși solvenți organici cu lipază din pancreas de porc la 20°C doar hexanul și toluenul s-au dovedit a fi corespunzători. În

hexan, după două ore de reacție, s-a obținut o conversie de peste 90% (Zaks și Klibanov, 1985).

În cazul sintezei esterului acidului lauric cu n-hexanolul, utilizând lipază din *Candida cylindracea* imobilizată prin legare cu glutaraldehidă pe un copolimer alcool polivinilic-polietilenimină după 22 de ore de reacție la 25°C în prezența unei cantități reduse de apă, solventul organic cel mai eficient s-a dovedit a fi izooctanul (randament cantitativ), urmat de n-heptan (randament 63,9%), toluen și benzen (randament 42,7%) (Ikeda, Sato și Suzuki, 1991).

Trei esteri aromatizanți au fost preparați prin esterificare directă din alcoolii și acizii corespunzători, în mediu de n-heptan și în prezența unei cantități reduse de apă (0,1%). În condițiile de reacție optimizate s-au sintetizat acetatul de izoamil (24 h, 30°C, randament 82%) cu lipază din *Mucor miehei*, 2-metilbutanoatul de etil (24 h, 55°C, randament 82%) cu lipază din *Candida antarctica* și acetatul de citronelil (24 h, 45°C, randament 98%) cu lipază din *Candida antarctica* (Fontayn, Lognay și Marlier, 1995).

După o rețetă asemănătoare, un alt colectiv a sintetizat o serie de esteri aromatizanți: acetat de izoamil, butirat de etil, butirat de izopropil, propionat de izoamil, butirat de izoamil cu randamente cuprinse între 92-97%, lucrând la 40°C, sub agitare, în mediu de n-hexan și la un conținut inițial de apă al sistemului de 0,4%. Enzima folosită a fost Lipozyme (Gubicza și Szakács-Schmidt, 1995).

Bloomer ș.a. au obținut o serie de esteri etilici ai acizilor grași cu lipază din *Rhizomucor miehei* (Lipozyme), utilizând drept mediu de reacție n-pentan sau n-hexan, la reflux și cu îndepărtarea apei formate în reacție. S-au obținut cu randamente de peste 99% esteri ai acizilor oleic, linoleic, α-linolenic și arahichidonic, fără a avea loc peroxidarea legăturilor duble. S-a sintetizat de asemenea și oleatul de oleil pe această cale, doar cu un grad scăzut de peroxidare (Bloomer, Adlercreutz și Mattiasson, 1992a). Stearatul de etil a fost obținut și la scară preparativă (2 kg). La un raport molar etanol/acid stearic de 1,25 și o concentrație de enzimă de 5% în masa de reacție, s-a ajuns la conversie de peste 99% după 90 de minute de refluxare în n-hexan (Bloomer, Adlercreutz și Mattiasson, 1992b).

O serie de esteri au fost sintetizați prin esterificare directă din acizii carboxilici și alcoolii corespunzători, cu lipază din *Candida cylindracea* imobilizată pe un suport de tip nylon, prin legare covalentă prin intermediul glutaraldehidei. Activitatea enzimei imobilizate a fost maximă în intervalul de temperatură cuprins între 25-37°C. Mediul de reacție utilizat a fost hexanul, în condiții aproape anhidre. Viteza inițială de formare a propionatului de etil din etanol și acid propionic a fost de 0,017 moli/h·g enzimă imobilizată. S-au sintetizat și alți esteri: butirat de etil, propionat de izoamil și butirat de izoamil, cu viteze inițiale comparabile, echilibrul de reacție atingându-se în mai puțin de 10 ore. Lipaza imobilizată s-a dovedit a fi stabilă, păstrând o treime din activitatea inițială după 72 ore de reutilizări repetate (Carta, Gainer și Benton, 1991). Sinteza esterilor menționați s-a realizat și în regim continuu, utilizând un reactor cu strat fix de catalizator (Carta, Gainer și Gibson, 1992).

Se poate deci constata că în ce priveşte tehnica realizării reacţiilor de esterificare în solvenţi organici, sunt posibile trei variante:

- *sisteme bifazice* constând dintr-un solvent organic nemiscibil cu apa şi o fază apoasă ce conţine enzima;

- *sisteme microapoase* (numite şi neapoase) în care enzima solidă (sub formă de pulbere sau fixată pe un suport insolubil) se găseşte în suspensie într-un solvent nepolar;

- *sisteme de micelii inverse sau microemulsii*, care sunt sisteme omogene ce pot fi considerate monofazice, deşi de fapt sunt constituite din două faze lichide.

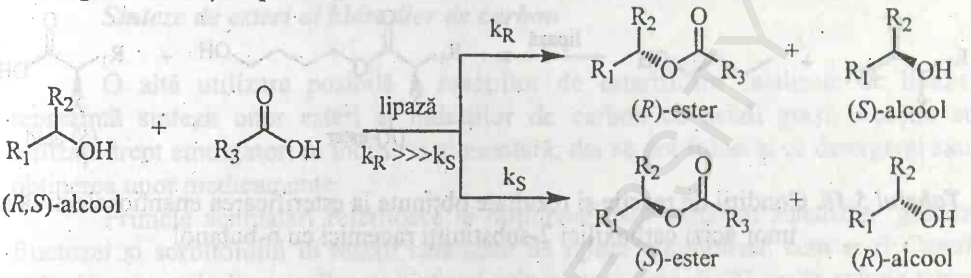
Monot ş.a. au studiat comparativ cele trei posibilităţi, utilizând ca model sinteza butiratului de butiril, care este posibilă în toate aceste cazuri. S-a constatat că din punct de vedere aplicativ sistemele microapoase şi cele bifazice lichide determină obţinerea unor rezultate la fel de bune, în timp ce sistemele micelare se recomandă doar în cazuri particulare compatibile cu constrângerile specifice pe care le implică, de exemplu la concentraţii scăzute de enzimă (Borzeix, Monot şi Vandecasteele, 1992). Aceste concluzii sunt contrazise de alţi autori care consideră sistemele de microemulsii apă-în-ulei mai avantajoase comparativ cu sistemele eterogene, datorită vitezelor mari de reacţie şi conversiilor ridicate obţinute (Stamatis ş.a., 1993), sau chiar a unei enantioselectivităţi mărite (Backlund ş.a., 1995).

O posibilitate interesantă este utilizarea lipsei de activitate a unor lipaze faţă de anumiţi acizi graşi nesaturaţi. O serie de lipaze, cum ar fi cele microbiene provenite din *Penicillium cyclopium, Candida cylindracea, Rhizomucor miehei, Rhizopus delemar, Geothricum candidum*, dar şi lipaza din seminţe de rapiţă manifestă o specificitate de substrat negativă faţă de acizii nesaturaţi ce au prima dublă legătură de la capătul carboxilic la un atom de carbon cu număr par. Acest tip de specificitate se bazează pe discriminare cinetică şi poate fi utilizată pentru îmbogăţirea în acizii respectivi a unor amestecuri de acizi graşi ce rezultă prin hidroliza anumitor uleiuri naturale (Mukherjee, 1995). Un astfel de acid este acidul γ-linolenic (all-cis-6,9,12-octadeca-trienoic) care prezintă interes biomedical considerabil (Hills, Kiewitt şi Mukherjee 1990a). Lipaza provenită din seminţe de rapiţă a fost utilizată pentru îmbogăţirea în acid γ-linolenic a amestecului de acizi graşi ce rezultă prin hidroliza uleiului din seminţe de luminiţa-nopţii (*Oenothera biennis*). Acest lucru s-a făcut prin esterificare selectivă enzimatică a amestecului respectiv cu n-butanol în n-hexan. Majoritatea acizilor graşi prezenţi s-au esterificat, cu excepţia acidului γ-linolenic. Dacă s-a utilizat lipază din *Rhizomucor miehei*, concentraţia de acid γ-linolenic din fracţiunea de acizi graşi neesterificată a ajuns la 75%. Această metodă este mai bună decât hidroliza enzimatică selectivă a uleiului corespunzător, care determină îmbogăţirea în acid γ-linolenic a fracţiunii de gliceride nehidrolizate (Hills, Kiewitt şi Mukherjee 1989; Hills, Kiewitt şi Mukherjee, 1990b; Mukherjee şi Kiewitt, 1991).

Un alt aspect important este că o serie de lipaze îşi menţin enantioselectivitatea demonstrată în reacţiile de hidroliză şi în solvenţi organici, atât în reacţiile de esterificare cât şi în cele de transesterificare (Holmberg ş.a., 1991). Au fost identificaţi

factorii structurali implicați în enantioselectivitatea lipazelor față de alcoolii secundari (Cygler, Grochulski și Schrag, 1995) și s-a semnalat și faptul că enantioselectivitatea lipazelor în solvenții organici depinde atât de modul în care a fost preparată enzima (Noritomi ș.a., 1996) cât și de natura solventului organic (Carrea ș.a., 1992).

A fost studiată reacția unor alcooli secundari alifatici C_5-C_{10} și a unor alcooli secundari aromatici cu acid dodecanoic, catalizată de lipaza din pancreas de porc, liberă sau imobilizată (Gerlach ș.a., 1989). Diferențierea între cei 2 enantiomeri se produce prin rezoluție optică cinetică:



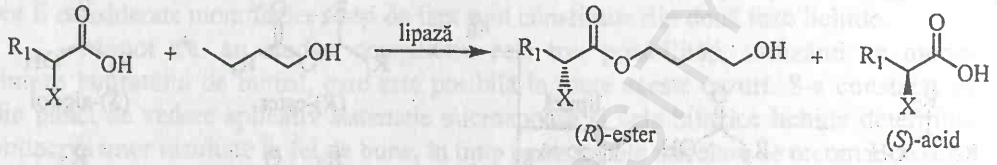
Tabelul 5.15. Esterificări enantioselective ale alcoolilor secundari optic activi cu acid dodecanoic, catalizate de lipaza pancreatică, liberă sau imobilizată

Denumirea alcoolului	Temp. (°C)	Timp (h)	Forma enzimei	Conversie (%)	e.e. (%)
2-pentanol	40	96	liberă	22	77,9
	70	48	liberă	21	87,4
2-hexanol	40	96	liberă	36	88,3
	70	48	liberă	30	95,8
	70	48	imobilizată	29	94,5
2-heptanol	40	96	liberă	31	91,4
	70	48	liberă	27	92,3
	70	48	imobilizată	32	94,4
2-octanol	40	96	liberă	39	88,0
	70	48	liberă	31	93,1
	70	48	imobilizată	36	94,9
1-fenil-etanol	40	96	liberă	35	95,4
	70	48	liberă	33	92,7
	40	96	imobilizată	36	99,1
1-fenil-1-propanol	40	96	liberă	19	90,8
	70	48	liberă	18	86,9
	40	96	imobilizată	16	99,6

Datorită vitezelor de esterificare diferite ale celor doi enantiomeri, se obține o îmbogățire în enantiomerul (*R*) al esterului obținut și în enantiomerul (S) al alcoolului rămas nereacționat. În cazul utilizării enzimei libere, conversiile au fost cuprinse între 8-39%, iar excesul de enantiomer (*R*) între 78-95%. În cazul folosirii enzimei

imobilizate, conversiile au fost asemănătoare, dar enantioselectivitatea a fost de cel puțin 94-95% (Gerlach ș.a., 1989). Pentru alcoolii aromatici, conversiile se situează între 14-35% (Tabelul 5.15).

Utilizând lipază din *Candida cylindracea*, Klibanov ș.a. au obținut o serie de esteri optic activi, pornindu-se de la acizi racemici și n-butanol, la 30°C (Tabelul 5.16). Reacția a avut un grad ridicat de enatioselectivitate, obținându-se de ficare dată izomerii (*R*) (Kirchner, Scollar și Klibanov, 1985).



Tabelul 5.16. Condiții de reacție și rezultate obținute la esterificarea enantioselectivă a unor acizi carboxilici 2-substituiți racemici cu n-butanol

R_1	X	Solvent	Timp (h)	Randament în (*R*)-ester (%)	e.e (%)
CH_3	Br	n-hexan	6	88	96
CH_3	Cl	n-hexan	6	87	95
$CH_3(CH_2)_3$	Br	n-hexan	19	91	99
$CH_3(CH_2)_{13}$	Br	n-hexan/butileter (1:1)	22	76	[a]
C_6H_5	Cl	n-hexan/butileter (1:1)	168	82	99
C_6H_5	Br	n-hexan/butileter (1:1)	216	81	99

[a] nu s-a reușit determinarea excesului enantiomeric

Esterificarea acidului octanoic cu 2-butanolul a fost realizată într-un reactor cu membrană poliamidică ce conținea enzimă din *Candida rugosa* imobilizată. În regim de exploatare continuu și la un conținut inițial optim de apă de 0,5% s-a obținut un exces enatiomeric de ester de cel puțin 85% (Ceynowa și Sionkowska, 1993).

Enantiomerii (*R*) ai esterilor acidului 2-clorpropionic cu diferiți alcooli au fost obținuți cu lipază din *Candida cylindracea* în solvenți nepolari la un conținut inițial de apă între 0,25-0,45%, enantioselectivitatea reacției depinzând mult de natura solventului și de distribuția apei între enzimă și solvent (Bodnar, Gubicza și Szabo, 1990). Acestă enantioselectivitate se poate corela liniar cu hidrofobicitatea solventului (exprimată prin log P), ea descrescând odată cu creșterea acesteia (Gubicza, 1992). O constatare interesantă a fost că înlocuirea apei cu etilenglicol în sistemul de reacție a dus la creșterea atât a activității cât și a enantioselectivității enzimei (Gubicza și Kelemen-Horváth, 1993; Gubicza și Szakács-Schmidt, 1994). În cazul esterificării enantioselective a acidului 2-brompropionic cu n-butanol, pentru a elimina efectul

nefavorabil al apei formate în reacție s-a lucrat în n-pentanol la reflux (35°C), apa fiind îndepărtată prin distilare heteroazeotropă (Gubicza și Szakács-Schmidt, 1995).

Esterificarea enantioselectivă a D,L-mentolului, cu obținerea (-)-mentil-esterilor corespunzători, s-a realizat utilizând ca agenți de acilare anhidride de acizi (acetică, propionică și butirică). Cele mai bune rezultate s-au obținut cu lipază din *Candida cylindracea* și anhidridă butirică, în n-hexan, la 30°C și timp de reacție 48 h, când s-a atins un exces enantiomeric de 86% (Wu, Akoh și Phillips, 1996).

Sinteze de esteri ai hidraților de carbon

O altă utilizare posibilă a reacțiilor de esterificare catalizate de lipaze o reprezintă sinteza unor esteri ai hidraților de carbon cu acizii grași. Aceștia sunt utilizați drept emulgatori în industria alimentară, dar se pot folosi și ca detergenți sau la obținerea unor medicamente.

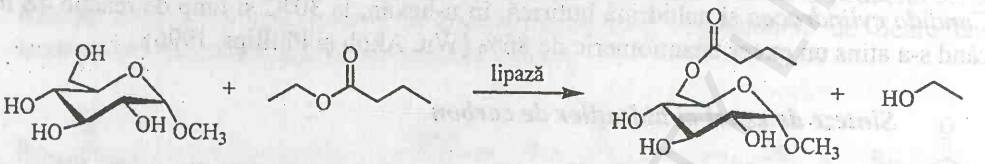
Primele semnalări referitoare la obținerea unor esteri ai zaharozei, glucozei, fructozei și sorbitolului în reacții catalizate de lipaze microbiene, cum ar fi *Candida cylindracea*, au indicat realizarea sintezei prin agitare timp de 72 ore în soluție tampon fosfat la 40°C, atingându-se grade de esterificare de până la 68% în cazul esterilor cu acid oleic (Lazar, 1985).

Cercetările ulterioare au mers pe două variante: fie utilizarea unor solvenți organici capabili să solubilizeze ambele substraturi, fie o "hidrofobizare" prealabilă a zaharurilor și realizarea reacției fără solvent. Deși prima variantă pare mai simplă, are dezavantajul că zaharurile nu sunt solubile decât într-un număr redus de solvenți organici hidrofili, cum ar fi piridina sau dimetilformamida, care nu sunt potriviți pentru reacțiile enzimatice și determină obținerea unor conversii destul de scăzute (Therisod și Klibanov, 1986; Therisod și Klibanov, 1987). Utilizarea terț-butanolului ca solvent pentru sinteza esterilor glucozei și fructozei cu acid stearic a dus la randamente de asemenea scăzute, între 10 și 24% (Oguntimein, Erdmann și Schmidt, 1993). Însă dacă acilarea unor dizaharide ca maltoza, zaharoza și lactoza a fost realizată prin transesterificare cu butanoat sau dodecanoat de etil, în terț-butanol, cu lipază imobilizată din *Candida antarctica*, pentru maltoză s-au semnalat conversii ridicate (Woundenberg-van Oosterom, van Rantwijk și Sheldon, 1996).

O soluție propusă pentru eliminarea acestor probleme a fost complexarea mono- și dizaharidelor prin reacție cu acid fenilboronic, ele devenind astfel solubile într-o serie de solvenți organici anhidri. Astfel, s-a reușit acilarea α-D-glucozei cu o serie de esteri și acizi, în terț-butanol și în prezența lipoprotein-lipazei din *Pseudomonas* sp., obținându-se după 24 de ore conversie de 100% dacă agentul de acilare a fost butiratul de vinil și 97% dacă s-a utilizat acid lauric (Ikeda și Klibanov, 1993).

O altă posibilitatea este transesterificarea 1-*O*-alchil-derivaților de monozaharide cu diferiți esteri. Utilizând lipază din *Candida antarctica* imobilizată s-au obținut esteri ai glucozei, fructozei și galactozei. S-a constatat că se acilează mai întâi grupele hidroxil primare, apoi cele secundare, în funcție de structura compusului,

o influență importantă asupra selectivității procesului având activitatea apei din sistem. Astfel, 1-*O*-metil-α-D-glucopiranoza s-a acilat cu butanoat de etil în exces (acesta îndeplinind și rolul de mediu de reacție, la alte sinteze s-a adăugat și terț-butanol), timp de 5 zile la 40°C, obținându-se numai monoesterul corespunzător cu o conversie de 98% (De Goede ș.a., 1994):



O altă metodă pare să fie mai atractivă din punct de vedere tehnologic (Vulfson, 1991). Ea se bazează pe utilizarea ca materii prime a acetalilor zaharidelor. Astfel, reacția de transesterificare dintre acetalul corespunzător și esterul metilic al acidului gras are loc fără solvent organic, iar produsul de reacție, mono- respectiv diesterul zaharidei se obține după hidroliza în mediu slab acid a acetal-esterilor corespunzători. Astfel s-au obținut, cu randamente bune, esteri cu acizii grași ai unor monozaharide ca glucoză, galactoză, xiloză (Fregrapane, Sarney și Vulfson, 1991; Fregrapane ș.a., 1992; Fregrapane ș.a., 1994; Fregrapane, Sarney și Vulfson, 1994), sau dizaharide ca lactoză și maltoză (Sarney ș.a., 1994).

6-O-monoesterii glucozei au fost obținuți la scară pilot (20 kg) din etil-D-glucopiranozidă (amestec de anomeri α și β) prin simplă încălzire cu o topitură de acizi grași la 70°C și presiune scăzută, timp de 28 de ore, în prezența lipazei imobilizate din *Candida antarctica*. S-au obținut conversii de peste 90% (Adelhorst ș.a., 1990).

O altă posibilitate de a obține esteri parțiali ai zaharurilor în cataliză enzimatică este cea care pornește de la esterii peracilați corespunzători obținuți pe cale chimică, de exemplu prin dezacilarea regioselectivă a octaacetil-zaharozei cu lipaze (Palmer și Terradas, 1994; Cruces ș.a., 1992). Au fost obținute rezultate bune și la interesterificarea pentaaacetil-glucozei cu uleiuri vegetale sau oleat de metil în solvenți organici în prezența lipazei imobilizate din *Candida antarctica* (Akoh, 1994).

5.3.2.2. Acilări și transesterificări enantioselective

Din numărul mare de hidrolaze cunoscute doar lipazele și subtilizina prezintă o activitate catalitică suficient de mare în solvenți organici cu conținut scăzut de apă pentru a putea fi folosite în sinteze asimetrice prin acilarea alcoolilor racemici sau prochirali, alcooliza alcoolilor acilați racemici sau prochirali și anhidridelor prochirale (Poppe și Novák, 1992; Klibanov, 1990). Lipazele sunt utilizate atât pentru acilarea diolilor prochirali sau alcoolilor racemici, cât și pentru alcooliza alcoolilor racemici acilați.

Acilarea unui diol prochiral sau a unui alcool racemic are loc într-un solvent organic cum ar fi dietileterul, diizopropileterul, terț-butimetileterul, tetrahidrofuranul, clorura de metilen, pentanul, hexanul sau toluenul. Reactivii de acilare utilizați sunt:

acetatul de vinil, butiratul de vinil, propionatul de vinil, lauratul de vinil, palmitatul de vinil, cloroacetatul de vinil, acetatul de izopropenilacetatul de etil, propionatul de etil, butiratul de trifluoroetil, acetatul de trifluoro etil, octanoatul de etil, anhidrida acetică, anhidrida succinică. Valorile exceselor enantiomerice pot creşte de la cele normale situate în jur de 90% până la peste 98-99%, cu dezavantajul scăderii randamentului, prin conducerea reacţiei de acilare până în punctul în care are loc şi formarea enantioselectivă a diacetatului, pentru că în majoritatea cazurilor enzima catalizează preferenţial transformarea enantiomerului care se găseşte în proporţia mai mică.

Enantioselectivitatea şi termostabilitatea enzimei pot fi crescute dacă se utilizează solvenţi organici cu conţinut redus de apă. O cantitate minimă de apă este necesară pentru a menţine activitatea catalitică a lipazei. În general se folosesc preparate comerciale de lipază (cu un conţinut rezidual de apă de care poate ajunge până la 7%) în solvenţi organici anhidri. În mod uzual termostabilitatea lipazelor este mult mai mare în solvenţi organici cu conţinut redus de apă decât în soluţii apoase. Dacă este necesar, conţinutul de apă al preparatului enzimatic poate fi redus prin uscarea acestuia în vid. O variantă avantajoasă pentru reacţiile de acilare este imobilizarea lipazei prin adsorbţie, care permite recuperarea uşoară prin filtrare şi reutilizarea sa şi asigură o suprafaţă mare de contact în reacţia eterogenă. Acetatul de vinil şi acetatul de izopropenil sunt cei mai buni agenţi de acilare, deoarece în urma reacţiilor respective se formează alcool vinilic şi alcool izopropenilic, care se tautomerizează în acetaldehidă, respectiv acetonă, în felul acesta reacţiile devenind ireversibile, iar conversia cantitativă. Efectul toxic posibil al acetaldehidei asupra enzimei nu este în general un impediment, deorece preţul redus al enzimei permite folosirea unor cantităţi mai mari. Imobilizarea de multe ori stabilizează enzima şi împotriva unui asemenea efect de dezactivare. Un alt avantaj important al obţinerii alcoolilor şi altor compuşi optic activi prin acilare este faptul că reacţiile având loc în mediu organic enzima se poate recupera şi reutiliza chiar dacă nu este în formă imobilizată.

Acilarea diolilor aciclici şi ciclici

O serie de derivaţi ai 1,3-propandiolului substituiţi în poziţia 2 cu grupe alchil, alcoxi, acilamino au fost supuşi acilării catalizate de lipaze iar monoacetaţii s-au obţinut cu exces enantiomeric de la moderat la mare, aşa cum se poate observa în Tabelul 5.17 (Drauz şi Waldmann, 1995). Agentul de acilare a îndeplinit şi rol de solvent. Randamentele obţinute au fost ridicate. Reacţiile în şi cu acetat de etil în general decurg mai încet decât reacţiile cu şi în acetat de vinil. Se remarcă mai ales rezultatele foarte bune obţinute cu lipaza din *Pseudomonas fluorescens*, folosind ca substrat 3-benziloxi-1,3-propandiolul.

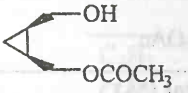
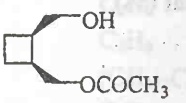
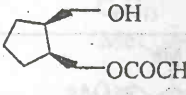
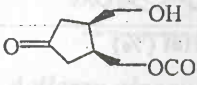
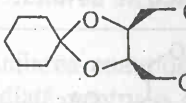
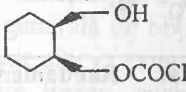
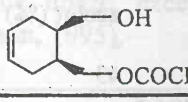
Tabelul 5.17. Acilarea enantioselectivă catalizată de lipaze a diolilor aciclici prochirali în solvenți organici, cu lipază din pancreas de porc (PPL) și *Pseudomonas fluorescens* (PFL)

R^1	R^2	Lipază	e.e. (%)	Randament (%)
CH_3	CH_2=CH	PFL	60	70
CH_2=CH-CH_2	CH_2=CH	PFL	81	89
CH_2=CH-$(CH_2)_2$	CH_3CH_2	PPL	90	70
C_6H_5	CH_3CH_2	PPL	92	98
$C_6H_5CH_2$	CH_3CH_2	PPL	13	90
$C_6H_5CH_2$	CH_2=CH	PFL	>94	100
1-$C_{10}H_7CH_2$	CH_2=CH	PFL	86	93
i-Pr	CH_2=CH	PFL	61	85
C_6H_{11}	CH_3CH_2	PPL	58	90
$C_6H_{11}CH_2$	CH_3CH_2	PPL	10	90
$C_6H_5CH_2OCONH$	CH_2=CH	PPL	97	77
$C_6H_5CH_2O$	$(CH_3)_2CH$	PFL	96	53
$C_6H_5CH_2O$	CH_2=CH	PFL	92	92
$C_6H_5CH_2O$	CH_3CH_2	PFL	90	88
C_2H_5O	C_6H_5	PFL	90	90

Egri ș.a. au studiat acilarea enantiotopic selectivă a unor derivați prochirali ai 2-aciloxi-1,3-propandiolului cu acetat de vinil. Cele mai bune rezultate au fost obținute folosind ca substrat 2-(4-metilbenzoil)oxi-1,3-propandiol și lipază pancreatică, într-un amestec 1:1 de tetrahidrofuran și hexan, la temperatura camerei. S-a obținut compusul (*R*)-monoacetilat cu un exces enantiomeric de peste 98% (Egri ș.a., 2000). Mai recent, rezultate la fel de bune au fost obținute folosind preparate brute de lipază din fungii termofile, în special *Talaromyces emersonii* NRLL-3221, care a catalizat acilarea enantioselectivă a 2-benzoiloxi-1,3-propandiolului, cu formarea compusului (*R*)-monoacetilat cu un exces enantiomeric de 94% (Bódai ș.a., 2003).

S-a studiat și acilarea enantioselectivă catalizată de lipaze a unor diolil prochirali ciclici, cu diferiți agenți de acilare cum ar fi acetatul de vinil, acetatul de etil sau anhidrida acetică. Din Tabelul 5.18 observă că s-au obținut excese enantiomerice și randamente ridicate.

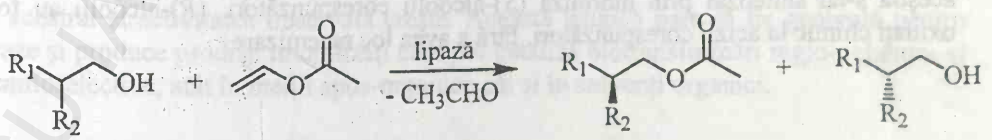
Tabelul 5.18. Acilarea enantioselectivă a diolilor ciclici prochirali în solvenți organici, cu lipază din pancreas de porc (PPL) și *Pseudomonas fluorescens* (PFL)

Monoacetatul sintetizat	e.e. (%)	Randament (%)	Lipază	Agent de acilare
	>95	82	PFL	Acetat de vinil
	88	87	PFL	Acetat de vinil
	>95	82	PFL	Acetat de etil
	>95	85	PFL	Acetat de vinil
	94	64	PPL	Acetat de vinil
	77	91	PPL	Acetat de vinil
	>98	78	PFL	Acetat de vinil
	94	71	PFL	Anhidridă acetică
	7	44	PFL	Acetat de vinil
	80	60	PFL	Acetat de vinil

Acilarea alcoolilor primari

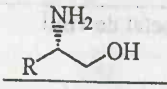
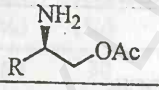
Un mare număr de alcooli primari, având substituenți cu azot sau oxigen legați de atomul de carbon chiral, se pot acila enantioselectiv cu acetat de vinil în prezența lipazelor, obținându-se ambii enantiomeri, ai alcoolului și acetatului, în general cu puritățI optice avansate. Câteva exemple sunt redate în Tabelul 5.19 (Drauz și Waldmann, 1995).

Enantioselectivitate remarcabilă s-au obținut la acilarea unei serii de alcooli primari cu un substituent alchil legat de atomul de carbon chiral. Reacția de rezoluție cinetică s-a efectuat cu acetat de vinil în clorură de metilen și a fost catalizată de lipaza din *Pseudomonas fluorescens*. În toate cazurile acilarea a fost (*S*)-specifică.

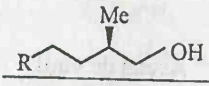
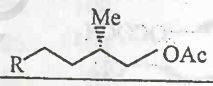


BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

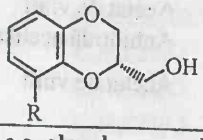
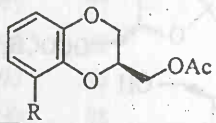
Tabelul 5.19. Acilarea enantioselectivă a amestecurilor racemice de alcooli aciclici primari cu acetat de vinil în solvenți organici, în prezența lipazei din pancreas de porc (PPL) și *Pseudomonas cepacia* (PCL)

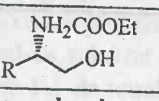
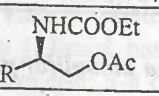
e.e. alcool (%)	R	Lipază	e.e. acetat (%)
85	Me	PPL	73
83	Et	PPL	78
99	Pr	PPL	99
95	Bu	PPL	95

e.e. alcool (%)	R	Lipază	e.e. acetat (%)
98	PhS	PCL	98
98	$PhSO_2$	PCL	98

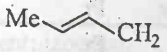
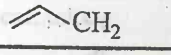
e.e. alcool (%)	Randament alcool (%)	Lipază	R	e.e. acetat (%)	Randament acetat (%)
>99	37	PCL	H	26	-
83	44	PCL	OMe	81	43

e.e. alcool (%)	Randament alcool (%)	Lipază	R	e.e. acetat (%)	Randament acetat (%)
90	31	PPL	Me	>95	30
>95	31	PPL	Et	92	32

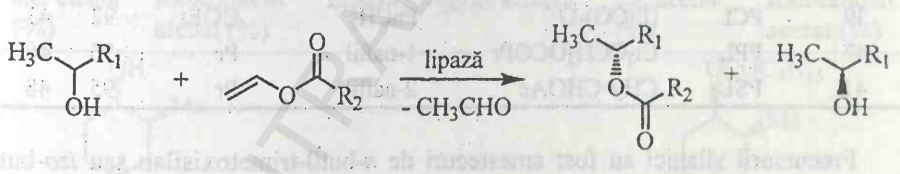
Rezultatele acilării alcoolilor primari cu o grupare alchil legată de atomul de carbon chiral sunt prezentate în Tabelul 5.20. (*R*)-2-alchil-1-alcanolii s-au obținut cu puritate enantiomerică foarte ridicată, însă puritatea enantiomerică a (*S*)-acetaților a fost mai modestă. Dacă însă ei au fost saponificați și alcoolii rezultați supuși unei a doua transesterificări, s-au obținut și (*S*)-acetații cu puritate optică avansată, iar din aceștia s-au sintetizat prin hidroliză (*S*)-alcoolii corespunzători. (*R*)-alcoolii au fost oxidați chimic la acizii corespunzători, fără a avea loc racemizare.

Tabelul 5.20. Obținerea alcoolilor primari cu substituent alchil la atomul de carbon chiral, prin acilări enantioselective cu acetat de vinil în CH_2Cl_2, catalizate de lipaza din *Pseudomonas fluorescens.* (Barth și Effenberger, 1993)

R_1	R_2	e.e. alcool (%)	Randament (%)
C_3H_7	CH_3	98	22
C_4H_9	CH_3	99	23
C_4H_9	C_2H_5	97,5	20
$(CH_3)_2CHCH_2$	CH_3	97,9	29
C_6H_{13}	CH_3	96,2	26
	CH_3	96	33
	CH_3	97,3	25

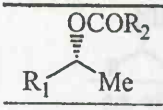
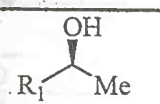
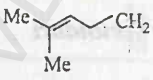
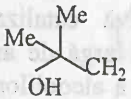
Acilarea alcoolilor secundari

Acilarea enantioselectivă catalizată de lipaze a alcoolilor secundari aciclici a fost studiată pentru o gamă largă de amestecuri racemice și s-a demonstrat că este metodă generală de obținere a alcoolilor secundari enantiomeric puri. În Tabelul 5.21 sunt redate câteva exemple de asemenea de reacții, realizate cu diferiți agenți de acilare și diferite lipaze, excesele enantiomerice obținute având valori ridicate (Drauz și Waldmann, 1995).



Rezultate recente (Reetz ș.a., 2003) demonstrează conversii și enantioselectivități înalte ale lipazelor entrapate în sol-gel în reacții de acilare enantioselectivă ale unor alcooli secundari aciclici. Entraparea lipazei în sol-geluri hibride hidrofobe, derivate dintr-un amestec de tetraalcoxisilan și silani alchil-substituiți, a dus la activitate înaltă și stabilitate ridicată a enzimei entrapate. Acestea sunt datorate interacțiunilor dintre domeniile lipofile ale enzimei și zonele hidrofobe ale catalizatorului, care au drept rezultat modificări conformaționale ale centrului activ, în special deplasarea capacului α-elicoidal. Astfel enzima devine accesibilă moleculelor de substrat și activitatea observată crește. Această tehnică pare să fie generală pentru lipaze și produce produși imobilizați care pot cataliza biotransformări regio-, chemo- și enantioselective, atât în medii apos-organice cât și în solvenți organici.

Tabelul 5.21. Esterificarea enantioselectivă a amestecurilor racemice de alcooli secundari aciclici, catalizată de lipaze în solvenți organici (PCL - lipaza din *Pseudomonas cepacia;* PPL – lipaza din pancreas de porc; CCL - lipaza din *Candida cylindracea;* PSL – lipaza din *Pseudomonas* sp.).

							
e.e. (%)	**Rand. (%)**	**Lipază**	**Agent de acilare**	**R_1**	**R_2**	**e.e. (%)**	**Rand. (%)**
93	38	CCL	Tributirină	C_2H_5	Pr	89	35
95	35	PPL	Cl_3CCH_2OCOPr	C_6H_{13}	Pr	90	30
92	41	CCL	Tributirină	C_6H_{13}	Pr	95	38
>99	44	PPL	Cl_3CCH_2OCOPr	C_8H_{17}	Pr	95	44
98	42	PPL	Cl_3CCH_2OCOPr	$C_{14}H_{29}$	Pr	>99	43
80	38	PPL	$CF_3CH_2OCOC_{11}H_{23}$		$C_{11}H_{23}$	>97	43
87	31	PPL	Cl_3CCH_2OCOPr		Pr	92	26
>99	45	PSL	CH_2=CHOAc	Ph	Ac	93	41
>95	39	PCL	Ac_2O	Ph	Ac	>95	43
>99	30	PSL	CH_2=CHOAc	$PhCH_2$	Ac	66	43
>95	39	PCL	$(EtCO)_2O$	$PhCH_2$	COEt	92	43
95	47	PPL	Cl_3CCH_2OCOPr	1-naftil	Pr	>95	46
>99	41	PSL	CH_2=CHOAc	2-naftil	Pr	95	48

Precursorii silanici au fost amestecuri de *n*-butil-trimetoxisilan sau *izo*-butil-trimetoxisilan şi tetrametoxisilan în raport 5:1. Alcoolul polivinilic şi alcoolul izopropilic au fost utilizaţi ca aditivi şi fluorura de sodiu ca şi catalizator. În unele experimente au fost utilizaţi aditivi adiţionali, un eter coroană (18-coroană-6) şi un surfactant (Tween 80). În unele cazuri enzimele imobilizate au arătat enantioselectivităţi neobişnuit de mari faţă de substraturi racemice. În Tabelul 5.22 sunt arătate activităţile relative (faţă de enzima liberă) şi enantioselectivităţile în reacţia de acilare cu acetat de vinil a 1-fenil-etanolului şi 1-naftil-etanolului racemic.

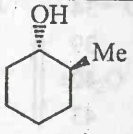
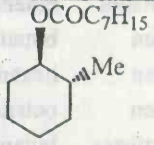
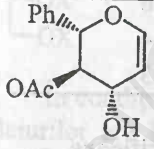
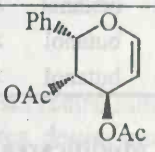
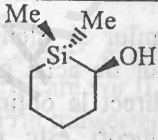
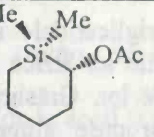
Tabelul 5.22. Rezoluția cinetică a unor alcooli secundari racemici în prezența lipazei din *Burkholderia cepacia,* liberă și încapsulată în sol-gel.

Substrat	Tipul lipazei	Aditiv	Activitate relativă	E
1-fenil-etanol[a]	liberă	-	1	> 100
	sol-gel	-	11,1	> 100
	sol-gel	18-coroană-6	16,8	> 100
	sol-gel	Tween 80	22,2	> 100
1-naftil-etanol[b]	liberă	-	1	> 100
	sol-gel	-	22,9	> 100
	sol-gel	18-coroană-6	15,1	> 100
	sol-gel	Tween 80	15,2	> 100

[a]solvent: izooctan
[b]solvent: toluen

Alcoolii secundari ciclici se pot acila de asemenea enantioselectiv in prezența lipazelor. În Tabelul 5.23 sunt prezentate câteva exemple de acest tip (Drauz și Waldmann, 1995).

Tabelul 5.23. Acilarea enantioselectivă a amestecurilor racemice de alcooli secundari ciclici catalizată de lipaze, în solvenți organici (CCL – lipaza din *Candida cylindracea;* PCL - lipaza din *Pseudomonas cepacia;* CAL – lipaza din *Candida antartica)*

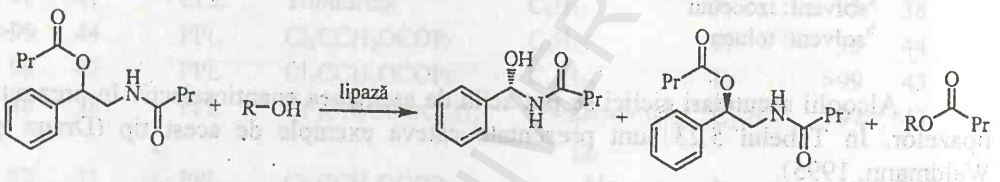
e.e. alcool (%)	Randament alcool (%)	Lipază	Agent acilare	e.e. acetat (%)	Randament acetat (%)
					
97	-	CAL	$EtSCOC_7H_{15}$	97	-
					
97	47	PCL	CH_2=CHOAc	97	47
					
96	36	CCL	Triacetină	95	48

BCU CLUJ/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Transesterificarea alcoolilor acilați

Transesterificarea enantioselectivă catalizată de hidrolaze a esterilor alcoolilor racemici cu alcooli achirali în solvenți organici cu conținut redus de apă este o altă posibilitate de a obține compuși optic activi. Ca alcooli se folosesc propanol, butanol și alții, iar ca solvenți hexan, diizopropileter, terț-pentanol, toluen, etc. În multe cazuri enantioselectivitatea și randamentul sunt mai mari pentru alcooliză decât pentru hidroliză în reacții catalizate de aceeași lipază, cu condiția utilizării unui mare exces de alcool.

În Tabelul 5.24 sunt prezentate valorile exceselor enantiomerice și randamentelor obținute la transesterificarea cu 1-alcooli alifatici a unor 1,2-aminoalcooli diacilați, în mediu de solvent organic, catalizată de lipaza din *Pseudomonas cepacia* (Kanerva, Rakiala și Vänttinen, 1992).



Tabelul 5.24. Rezoluția optică prin prin transesterificare cu lipază a 1,2-aminoalcoolilor diacilați

Solvent	Alcool	e.e. ester (%)	Randament ester (%)	e.e. alcool (%)	Randament alcool (%)
t-Pentanol	butanol	>95	33	>95	34
Toluen	butanol	>95	40	>95	39
Toluen	hexanol	>95	46	>95	42
Toluen	octanol	>95	41	>95	43
Dibutileter	butanol	>95	39	>95	45
Dibutileter	hexanol	>95	41	>95	36
THF	butanol	>79	45	>95	44
Acetonitril	butanol	>85	46	>95	43

5.3.2.3. Modificarea trigliceridelor prin trans- și interesterificare

Trigliceridele sunt componentele majoritare ale grăsimilor și uleiurilor și proprietățile lor fizice depind de structura și distribuția resturilor de acizi grași din moleculele lor. Grăsimile și uleiurile naturale pot fi utilizate direct la obținerea de diferite produse alimentare, singure sau în amestec, însă uneori este necesară modificarea unora din proprietățile lor, în special a punctului de topire, pentru a le face

B.C.U. "M. EMINESCU" IAŞI

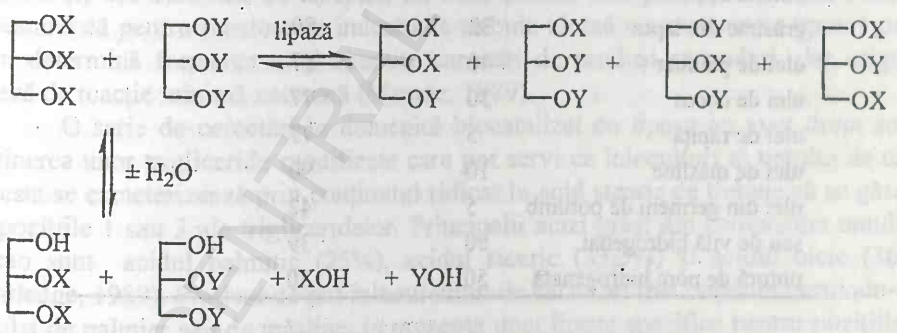
corespunzătoare unor utilizări speciale. În industria grăsimilor şi uleiurilor au fost dezvoltate procese de modificare a compoziţiei amestecurilor de trigliceride. Astfel, cristalizarea fracţionată este utilizată pentru a separa grăsimile în fracţiuni solide şi lichide, iar hidrogenarea reduce gradul de nesaturare a trigliceridelor, determinând creşterea punctului de topire.

Modificarea chimică sau enzimatică a trigliceridelor se poate realiza prin următoarele modalităţi (Drew, Wang şi Blanch, 1984; Adlercreutz, 1994; Akoh, 1996):

- hidroliză totală sau parţială, care a fost discutată anterior;
- transesterificare, prin reacţia cu un alcool (alcooliză), de preferinţă glicerină, obţinându-se mono- şi digliceride, sau prin reacţia cu un acid gras (acidoliză), obţinându-se trigliceride cu o compoziţie în acizi graşi diferită de cea iniţială;
- interesterificare, prin reacţia cu un alt ester, care poate fi o trigliceridă sau un ester de acid gras, obţinându-se trigliceride cu diferite distribuţii de acizi graşi.

Utilizând specificitatea catalitică cunoscută a lipazelor pot fi obţinute amestecuri de trigliceride care nu pot fi produse prin metodele clasice de trans- şi interesterificare. Aceste reacţii utilizează un sistem bifazic în care reactanţii şi produşii se găsesc într-o fază organică, în timp ce enzima este prezentă într-un mic volum de fază proteică hidratată.

Datorită reversibilităţii reacţiei catalizate de lipază, la amestecarea grăsimilor şi uleiurilor cu lipaze au loc atât hidroliza cât şi resinteza trigliceridelor. Aceasta determină un schimb între resturile de acizi graşi din moleculele trigliceridelor, conform schemei următoare, în care X şi Y reprezintă grupări acil (Macrae, 1985):



În condiţiile în care conţinutul de apă în sistem este redus, hidroliza grăsimilor şi uleiurilor are loc în proporţie mică şi interesterificarea devine reacţia principală. Lipaza din această schemă este 1,3-selectivă, altfel numărul de produşi posibili este mai mare.

Câteva exemple mai concludente de asemenea reacţii de trans- şi interesterificare vor fi prezentate în continuare.

Prin transesterificarea uleiului de ricin cu alcooli graşi (de la decil la octadecil), în raport molar de 1/2,2 la temperatura de 60°C şi presiune scăzută (2-5 mm Hg), după

4 ore de reacţie s-au obţinut randamente medii de 65% în ester ricinoleic şi 32% în monogliceridă. S-a utilizat lipază 1,3-specifică din *Mucor miehei*, în concentraţie de 10% faţă de masa de reacţie totală (Ghoshray şi Battacharya, 1992).

Prin gliceroliza seului de vită fără a se utiliza solvenţi organici sau emulgatori, Yamane ş.a. au obţinut monogliceride cu un randament care a depins mult de temperatura de reacţie. Cel mai mare randament în monogliceridă, de aproximativ 70%, s-a obţinut la 42°C şi un raport glicerină/seu între 1,5-2,5. Un conţinut de apă de peste 8% a fazei glicerinice determină scăderea randamentului în monogliceridă şi creşterea conţinutului în acizi graşi liberi. Dintre lipazele microbiene testate, cele mai bune s-au dovedit a fi cele din *Pseudomonas fluorescens* şi *Chromobacterium viscosum* (McNeill, Shimizu şi Yamane, 1990).

O serie de alte grăsimi şi uleiuri au fost transesterificate în mod asemănător cu 500 unităţi/g grăsime lipază din *Pseudomonas fluorescens* (Tabelul 5.25) (McNeill, Shimizu şi Yamane, 1991).

Tabelul 5.25. Gliceroliza unor grăsimi şi uleiuri cu lipază din *Pseudomonas fluorescens*

Denumirea grăsimii sau uleiului	Temperatura optimă (°C)	Randament maxim în monogliceride (%)
seu de vită	42	76
untură de porc	30	69
grăsime din lapte	32	80
ulei de palmier	40	67
ulei de cocos	30	77
ulei de rapiţă	5	77
ulei de măsline	10	90
ulei din germeni de porumb	5	42
seu de vită hidrogenat	50	39
untură de porc hidrogenată	50	30

Randamentele de obţinere a monogliceridelor pe bază de seu de vită şi ulei de palmier au crescut la peste 90% dacă s-a utilizat o temperatură de reacţie programată în trepte: 42°C timp de 8-16 ore, urmată de menţinere la 5°C timp de 4 zile (McNeill şi Yamane, 1991). Prin gliceroliza uleiului de măsline cu lipază din *Pseudomonas species* imobilizată prin adsorbţie pe $CaCO_3$, s-au obţinut randamente de 90% după 72 de ore de reacţie, iar catalizatorul enzimatic s-a recuperat şi s-a reutilizat, menţinându-şi 60% din activitatea iniţială după zece reutilizări (Roşu ş.a., 1997).

Spre deosebire de procesele chimice de modificare a trigliceridelor, la cele catalizate de enzime pot fi utilizaţi drept reactanţi amestecuri de trigliceride şi acizi

graşi. În aceste cazuri are loc un schimb între acidul gras şi un rest acil al trigliceridei (acidoliză), obţinându-se trigliceride cu un conţinut mai ridicat în acidul gras adăugat. În acelaşi scop pot fi utilizaţi drept reactanţi alchil-esterii acizilor graşi şi trigliceride, în reacţii de interesterificare. Aceste procese de trans- şi interesterificare enzimatice pot fi realizate fie discontinuu, în reactoare cu amestecare, fie continuu, în reactoare cu strat fix, fiind preferată cea de-a doua variantă. Pentru operare în reactoare cu strat fix, reactanţii sunt trataţi în prealabil pentru a îndepărta inhibitorii enzimei şi dacă este cazul, dizolvaţi în hexan sau eter de petrol. În amestecul de reacţie se adaugă o mică cantitate de apă, după care acesta se pompează continuu peste un strat de catalizator de lipază imobilizată. Prezenţa apei dizolvate în fluxul de materiale determină formarea unor cantităţi minore de produşi secundari de hidroliză: digliceride şi acizi graşi (Macrae, 1989).

Efectele diferiţilor parametri de reacţie, cum ar fi conţinutul de apă al amestecului de reacţie şi prezenţa solventului organic, asupra reacţiilor de transesterificare catalizate de lipaze au fost studiate detaliat.

Astfel în cazul reacţiei dintre ulei de măsline (1 parte) şi palmitat de metil (0,96 părţi), catalizată de Lipozyme Novo, utilizând ca solvent o fracţiune uşoară de petrol (100-120°C), într-un reactor continuu cu catalizator în strat fix şi la temperatura de 40°C, s-a studiat efectul concentraţiei solventului şi al apei în amestecul de alimentare al reactorului. S-a constatat că modificarea concentraţiei solventului are o influenţă mică atât asupra vitezei de reacţie cât şi asupra formării produşilor secundari. În acelaşi timp însă atât viteza de reacţie cât şi conţinutul în produşi secundari au scăzut cu scăderea concentraţiei apei în sistem. În absenţa apei, viteza de reacţie a fost foarte scăzută şi, aşa cum era de aşteptat, nu s-au format nici produşi secundari. Aceasta înseamnă că pentru reactoarele industriale trebuie aleasă o concentraţie optimă de apă care determină formarea unei anumite cantităţi de produşi secundari, dar asigură o viteză de reacţie minimă necesară (Macrae, 1989).

O serie de cercetări în domeniul biocatalizei cu lipaze au avut drept subiect obţinerea unor trigliceride modificate care pot servi ca înlocuitori ai untului de cacao. Acesta se caracterizează prin conţinutul ridicat în acid stearic ce trebuie să se găsească în poziţiile 1 sau 3 ale trigliceridelor. Principalii acizi graşi din compoziţia untului de cacao sunt acidul palmitic (25%), acidul stearic (33,3%) şi acidul oleic (36,1%) (Ratledge, 1989). Produse ce pot înlocui untul de cacao au fost obţinute pornindu-se de la ulei de palmier sau de măsline, în prezenţa unei lipaze specifice pentru poziţiile 1 şi 3 ale trigliceridelor. Acidul oleic din poziţiile 1 şi 3 ale trigliceridelor componente a fost înlocuit de acid palmitic, respectiv stearic, prin transesterificare sau interesterificare.

Experimentările făcute la firma Novo au utilizat lipază microbiană precipitată pe Celite drept catalizator şi un reactor tip coloană. Amestecul de reacţie a constat din ulei de măsline, acid palmitic şi eter de petrol în raport 1:1:30. Conţinutul iniţial de apă al sistemului a fost de 10% în greutate raportat la enzimă, iar temperatura a fost menţinută la 40°C. Viteza de trecere prin coloană s-a calculat astfel încât să corespundă unei conversii de 65% (considerând poziţiile 1 şi 3 ale trigliceridei). După o

funcționare de aproximativ 1000 ore s-a calculat productivitatea în kg grăsime/kg enzimă. S-a constatat o activitate inițială de 1,0-1,5 g grăsime/h/g enzimă și un timp de înjumătățire a activității de aproximativ 600 de ore, ceea ce conduce la o productivitate de 520-780 kg grăsime la 1 kg enzimă după 800 ore (33 de zile), activitatea reziduală fiind de 40%. Această productivitate depinde de temperatură, raportul reactanților, concentrația substratului și valoarea conversiei necesare (Nielsen, 1985).

Un exemplu tipic de reacție de transesterificare în sistem discontinuu a utilizat drept materii prime o fracțiune medie de ulei de palmier (1 parte) și acid stearic (0,5 părți) dizolvate în eter de petrol. Catalizatorul folosit a fost obținut prin imobilizarea lipazei 1,3-specifice din *Aspergillus niger* pe Kieselguhr și hidratare. Amestecul de reacție s-a agitat timp de 16 ore la temperatura de 40°C. Reacția de transesterificare a fost însoțită de formarea digliceridelor și acizilor grași ca produși secundari. Majoritatea acestora s-a format în prima oră de reacție. Analiza produșilor de reacție a arătat creșterea conținutului în acid stearic al produsului și încorporarea resturilor de acid stearic în pozițiile 1 și 3 ale trigliceridelor (Macrae, 1983).

Lipaza din pancreas de porc, care este de asemenea 1,3-specifică, poate fi utilizată și ea pentru obținerea de înlocuitori de unt de cacao prin transesterificare. Ca solvent pentru aceste reacții, cel mai adecvat s-a dovedit a fi n-hexanul. Astfel, la transesterificarea uleiului de măsline cu acid stearic în n-hexan, utilizând lipază din *Rhizopus delemar* dizolvată în glicerină, după trei zile de reacție la 40°C s-a obținut un conținut în acid stearic al trigliceridei de 40% (Lazar, 1985).

Un înlocuitor de unt de cacao având un conținut de acid stearic corespunzător celui din fracțiunea medie de ulei de palmier interesterificat s-a obținut și pe bază de ulei de floarea-soarelui. Acesta a fost interesterificat cu stearat de etil, în prezență de Lipozyme. Un produs cu conținutul de acid stearic încorporat dorit s-a obținut după 140 de minute la 50°C, la un conținut de 5% enzimă față de masa de reacție și în același timp cantitățile de acizi grași liberi și trigliceride formate au fost scăzute (6-7%), iar formarea tristearinei nu a fost observată (Bloomer, Adlercreutz și Mattiasson, 1992b).

Au fost studiate și o serie de alte variante ale reacțiilor de transesterificare ale trigliceridelor catalizate de lipaze, reactanții și condițiile de reacție diferind în funcție de scopul urmărit.

Astfel, transesterificarea uleiului de floarea-soarelui cu un acid gras cu lungime medie a catenei hidrocarbonate, duce la obținerea unor trigliceride ce conțin resturi acil cu catene de lungime medie în pozițiile 1 și 3 și cu catene lungi în poziția 2. Asemenea produse, care nu se întâlnesc în natură și sunt dificile de obținut prin sinteză chimică, pot avea aplicații interesante ca produse dietetice (Valivety, Halling și Macrae, 1992).

Interesterificarea uleiului de rapiță cu o fracțiune de grăsime din unt cu punct de topire ridicat, catalizată de lipaza nespecifică din *Candida cylindracea*, duce la o schimbare statistică a resturilor acil, similară cu cea de la interesterificarea chimică (Valivety, Halling și Macrae, 1992). O altă variantă de interesterificare a uleiului de rapiță, cu seu de vită, duce la amestecuri de grăsimi cu puncte de topire mai scăzute, această scădere fiind de până la 12°C (Forssell ș.a., 1992).

Acidul linolenic este un component nedorit al uleiului de soia, datorită rezistenței sale scăzute la oxidare. S-a reușit o reducere substanțială al acestui conținut prin transesterificarea uleiului de soia cu acid lauric, palmitic sau oleic, la temperaturi scăzute (10°C) utilizând drept catalizator Lipozyme și, într-o măsură mai mică, lipază pancreatică.

S-a realizat și interesterificarea trioleinei cu trigliceride conținând resturi acil cu catenă scurtă sau medie în așa-zise "microemulsii inverse" similare cu miceliile inverse. De asemenea, a fost semnalată utilizarea bioxidului de carbon supercritic drept mediu de reacție pentru transesterificarea trioleinei cu acid stearic, catalizată de lipaze din *Rhizopus delemar, Rhizopus japonicus, Alcaligenes species* și *Mucor miehei* (Valivety, Halling și Macrae, 1992). În aceste direcții cercetările sunt abia la început, dar ele prezintă de pe acum perspective deosebite de aplicare în viitor.

Interesterificarea trioleinei cu caprilat de etil în prezența lipazei imobilizate din *Candida antarctica* a dus la un produs conținând 62% dicaprilooleină, 33,5% monocaprilooleină și 12,3% trioleină nerecționată. Asemenea reacții se pot utiliza pentru obținerea unor trigliceride cu o anumită structură dorită, ce conțin resturi de acizi grași cu catenă medie și care se folosesc în medicină (Huang și Akoh, 1996).

Reacțiile de transesterificare catalizate de lipază pot fi utilizate de asemenea pentru obținerea unor amestecuri de trigliceride având proprietăți funcționale prețioase pentru realizarea produse cu conținut caloric scăzut și grăsimi utilizate în panificație, cum ar fi margarinele. O serie de alte lipide pot fi modificate prin reacții de interesterificare catalizate de lipaze, de exemplu fosfolipidele (Svensson, Adlercreutz și Mattiasson, 1990; Sarney, Fregrapane și Vulfson, 1994).

Se poate afirma că în prezent tehnologiile enzimatice de esterificare și transesterificare sunt orientate în direcția obținerii unor produse cu valoare comercială mai ridicată. Principalul lor inconvenient este prețul ridicat al catalizatorului. Utilizarea eficientă a enzimelor pentru obținerea produselor menționate este legată de necesitatea ca tehnologiile respective să devină mai ieftine, utilizând catalizatori mai productivi și/sau mai ieftini.

6. APLICAȚII INDUSTRIALE ALE ENZIMELOR

Una dintre principalele provocări pe care trebuie să le rezolve industria chimică în viitorul apropiat este cea a resurselor pe care le utilizează. Atunci când se vorbește despre perspectivele viitoare, acestea sunt tot mai frecvent asociate cu utilizarea unor resurse reînnoibile, deși au fost și vor fi făcute progrese importante și în ce privește creșterea productivității și reducerea consumurilor de energie ale proceselor existente. Pe calea utilizării unor asemenea resurse se situează valorificarea proceselor catalizate de enzime pentru obținerea de produse chimice. Industria bazată pe biotransformări încă nu realizează o valoare de piață așa de mare ca industria chimică și este orientată în special spre industria farmaceutică, întrucât companiile farmaceutice au fost printre puținele capabile să finanțeze cheltuielile mari legate de dezvoltarea acestor procese.

Principalele avantaje pe care le oferă biotransformările sunt versatilitatea, selectivitatea de substrat, regioselectivitatea, enantioselectivitatea, cataliza la temperatură și presiune ambiantă. Enzimele sunt niște catalizatori remarcabili, capabili să accepte o mare varietate de compuși drept substraturi și manifestând în același timp și o selectivitate deosebită. Această selectivitate poate fi atât optică (enantioselectivitate) cât și poziționlă (regioselectivitate). Drept rezultat, enzimele pot fi utilizate pentru realizarea unor transformări extrem de complexe, fără a fi necesare etapele de protejare și deprotejare care sunt caracteristice sintezelor organice enantio- și regioselective. Această selectivitate ridicată duce și la o cantitate mai mică de produse secundare și deșeuri, recomandând enzimele drept alternative pentru realizarea unor tehnologii mai puțin poluante decât cele realizate cu catalizatori clasici. Specificitatea de substrat a enzimelor nu este limitată, cum s-ar putea crede, ele acceptând în majoritatea cazurilor o gamă foarte diversă de compuși ca substraturi. Acest lucru este valabil mai ales în cazul hidrolazelor: lipaze, proteaze, esteraze, care de multe ori pot transforma compuși ale căror structuri sunt foarte diferite de cele ale substraturilor lor naturale. Specificitatea de substrat este limitată doar în cazurile enzimelor care au funcția de a converti molecule mici, de exemplu catalaza (care are ca substrat apa oxigenată) sau aspartaza (care are ca substrat acidul fumaric). Mai există enzime cu specificitate ridicată în organismele evoluate, însă marea majoritate a celor din microorganisme au o slabă specificitate de substrat, ceea ce le face accesibile pentru un mare număr de biotransformări.

În ultima perioadă, cataliza enzimatică s-a impus pentru fabricarea unor produse de sinteză organică fină, polimeri, sau chiar produse chimice de mare tonaj. Astfel, nitril hidrataza se folosește pentru hidroliza acrilonitrilului la acrilamidă cu o conversie aproape cantitativă a substratului, în condiții de reacție mai blânde decât cele aplicate în cazul procesului chimic corespunzător. Majoritatea proceselor industriale care utilizează enzime au drept caracteristici comune productivitatea ridicată, concentrația ridicată a produsului, lipsa produselor secundare nedorite și folosirea unor enzime care nu necesită cofactori scumpi. În ce privește viitorul acestor procese, el va depinde de disponibilitatea unor biocatalizatori de mare eficiență, motiv din care

eforturile de cercetare sunt concentrate în mare măsură în direcția obținerii de enzime cu proprietăți superioare prin evoluție direcționată.

Rezultatele din ultima perioadă au arătat că există surprinzător de puține bariere în calea utilizării enzimelor și a celulelor întregi drept biocatalizatori în sinteza organică. Enzimele izolate sunt folosite mai ales în reacții de hidroliză și izomerizare, în timp ce celulele întregi se folosesc în special în reacții de sinteză care necesită participarea unui cofactor ce trebuie apoi regenerat. Deși această regenerare este posibilă și *in vitro*, este mai ieftin și mai simplu să se realizeze această regenerare chiar în interiorul celulei. La ora actuală există o serie de procese foarte aproape de aplicare industrială, bazate pe rezultatele cercetărilor efectuate în instituții academice sau unități de producție. Aceste rezultate sunt efectul a două procese care au loc în paralel în țările dezvoltate: întreprinderile din domeniul chimiei angajează tot mai mulți specialiști în biochimie și biotehnologie iar chimiștii organicieni adoptă tot mai mult biocataliza drept o modalitate de a rezolva sintezele complicate.

Dezavantajul principal al biotransformărilor este legat de costurile mai ridicate în comparație cu procesele chimice existente, în special în cazul produselor chimice uzuale și de infrastructura de producție care se găsește în spatele proceselor chimice.

Biocatalizatorii utilizați în procesele industriale pot fi:

- enzime solubile sau imobilizate;
- celule întregi de biocatalizatori, care nu mai au activitate metabolică dar își mențin una sau mai multe dintre activitățile enzimatice;
- procese fermentative directe pentru obținerea unui intermediar sau produs final, care utilizează o sursă ieftină de carbon atât pentru creșterea organismului cât și pentru realizarea unor reacții de oxidare sau reducere ale substratului.

Biotransformările care utilizează celule întregi sau procese fermentative au apărut înaintea celor care folosesc enzime izolate și la ora actuală încă se fabrică industrial cantități mai mari de produse folosind asemenea procese. Excepție face fructoza, care se fabrică la nivel de 8 milioane tone/an, egal cu cel al alcoolului etilic, care este produsul de fermentație fabricat în cel mai mare tonaj.

Procesele fermentative prezintă avantajul că o serie complexă de transformări chimice pot fi realizate practic într-o singură etapă, exemplul cel mai elocvent fiind transformarea glucozei în etanol. În plus, concentrația produsului în masa de fermentație poate fi foarte ridicată, astfel în cazul acidului citric, acidului lactic sau glutamatului monosodic ea poate ajunge la 100 g/l. Totuși, se constată o tendință de descreștere a fabricării produselor chimice prin fermentație. Acest lucru se datorește faptului că produsul dorit este prezent în masa de fermentație alături de mulți alți de compuși. Din acest motiv purificarea sa este de multe ori costisitoare, iar eliminarea unora dintre produsele secundare care au efect toxic poate fi dificilă.

Diferențierea dintre procesele fermentative și cele care folosesc celule întregi se face prin faptul că ultimele sunt în general procese într-o singură etapă realizate cu celule întregi, care însă nu trebuie să fie vii și în curs de creștere ci servesc doar ca sursă de enzime. Un exemplu clasic în acest sens este oxidarea D-sorbitolului la L-sorboză.

Dacă este vorba de un proces complex care are loc în mai multe etape, fermentația va fi preferată biocatalizei cu enzime, chiar dacă produsul respectiv ar putea fi fabricat și printr-o succesiune de reacții catalizate de enzime izolate, fiind foarte puțin probabil ca astfel de proces să fie viabil din punct de vedere comercial. Dacă însă este vorba de un proces într-o singură etapă, alegerea tehnologiei celei mai convenabile este mai dificilă. Teoretic, este mai avantajos să fie folosită întreaga celulă fără a mai fi necesară operațiile costisitoare de izolare și purificare a enzimei, mai ales când această enzimă s-ar putea dovedi instabilă *in vitro* sau când nu este vorba de cantități mari de produs fabricat. Dacă însă există o enzimă comercială disponibilă ce poate cataliza transformarea respectivă este în general mai avantajos să se apeleze la ea. Utilizarea enzimelor izolate, mai ales a celor imobilizate, mai prezintă avantajul că ele se pot folosi exact ca orice alt tip de catalizator, lucru important în condițiile în care mai ales în rândul chimiștilor există destule reticențe în ce privește lucrul cu celule de microorganisme, chiar dacă acestea nu sunt patogene.

Multe din aceste procese realizează produse având molecule chirale, în cantități de la câteva sute de kg la mii de tone pe an. Există însă și aplicații în domeniul produselor chimice uzuale care nu sunt chirale. Pe termen mediu, impactul cel mai important al biotransformărilor în industria chimică se prevede a fi legat de valorificarea unor materii prime existente în condițiile reducerii cantităților de produse secundare și deșeuri rezultate.

În prezent, în practica industrială sunt folosite aproximativ 100 biotransformări diferite, majoritatea având ca scop obținerea unor intermediari chirali pentru produse farmaceutice sau agrochimice, dar există aplicații și pentru obținerea unor produse chimice de mare tonaj ca acrilamida (Wandrey, Liese și Kihumbu, 2000). Conform rapoartelor oficiale, în 2002 veniturile generate pe plan mondial din vânzarea produselor chirale au atins 7 miliarde de dolari, din care 55% au fost produse obținute prin tehnologii clasice (separare fizico-chimică a enantiomerilor), 35% prin sinteză chimică asimetrică și 10% prin biocataliză. Se estimează că în 2005, dintr-un venit total de 9,5 miliarde dolari, 49% vor fi obținute prin tehnologii clasice, 36% prin sinteză chimică asimetrică și 15% prin biocataliză. Estimarea pe o perioadă mai îndepărtată arată o creștere continuă atât a pieței acestor produse (cu 11,9% pe an) cât și a ponderii biocatalizei. Astfel, în 2009 se estimează un venit total de 14,94 miliarde dolari pentru produse chirale, din care 41% realizate prin tehnologii clasice, 36% prin cataliză chimică asimetrică și 22% prin biocataliză (Rouhi, 2004). Cererea pentru compuși chirali puri crește continuu, mai ales în industria farmaceutică, dar și în alte trei sectoare: chimia compușilor odorizanți și aromatizanți, agrochimie și chimia produselor speciale. Industria farmaceutică se situează pe primul loc, deoarece în multe cazuri cei doi enantiomeri ai unui compus chiral pot avea activitate biologică complet diferită. Inițial majoritatea ingredientelor farmaceutice active erau formulate ca amestecuri racemice, însă acum accentul se pune pe compușii chirali.

Una dintre problemele principale este faptul că selectarea catalizatorului încă se face empiric. Atunci când se pune problema sintetizării unei anumite structuri este foarte greu de prezis care catalizator va fi cel mai adecvat. Acest lucru se datorește

faptului că mecanismul reacțiilor nu este încă elucidat decât în mică măsură și în majoritatea cazurilor încercările pentru noi procese se bazează pe analogii cu cele deja existente. Selectarea catalizatorului, nu doar în biocataliză ci și în cataliza chimică asimetrică, nu este numai o știință ci și o adevărată artă, în care intuiția și chiar norocul pot juca un rol important. O altă problemă cheie este accesibilitatea substratului, pentru că uneori sinteza acestuia este mai problematică decât reacția catalitică propriu-zisă. Accesibilitatea catalizatorului este de asemenea importantă, el trebuind să fie pe cât posibil un produs comercial accesibil în cantități mari și la preț cât mai redus. Alte probleme care pot apare sunt de natură tehnologică: controlul temperaturii, transferul de masă, agitarea, recuperarea solventului și a catalizatorului influențează economicitatea procesului și în caz nefavorabil pot împiedica industrializarea unei anumite reacții chiar dacă rezultatele la nivel de laborator sunt promițătoare.

Enzimele cele mai utilizate până în prezent au fost hidrolazele, în medii de reacție apoase. La ora actuală, o serie de procese, majoritatea aflate în curs de dezvoltare, folosesc enzime din clasa oxidoreductazelor. O altă clasă de enzime cu aplicații tot mai importante este cea a liazelor, care pot fi folosite pentru realizarea unor legături C-C. În viitor, se va înregistra o creștere a ponderii și importanței reacțiilor de transformare și sinteză în detrimentul celor de degradare. De asemenea va crește rolul reacțiilor enzimatice în solvenți organici. La ora actuală se înregistrează un reviriment puternic al reacțiilor biocatalitice realizate cu celule întregi, care din punct de vedere istoric au reprezentat prima categorie de reacții aplicate industrial. Dezavantajul major al utilizării celulelor întregi, posibilitatea desfășurării în paralel a unor reacții secundare datorită existenței și altor enzime în celulă, se poate elimina cu ajutorul unor modificări genetice la nivelul celulei. În viitor, evoluția direcționată a enzimelor va fi utilizată pentru a obține biocatalizatori care să lucreze mai eficient în condiții nenaturale. O perspectivă extrem de promițătoare este combinarea mai multor enzime într-o singură celulă, de exemplu pentru a realiza simultan cu reacția principală și regenerarea cofactorului. În ce privește enzimele izolate, prețul acestora va scădea în continuare, datorită obținerii lor mai eficiente folosind microorganisme modificate genetic. Distanța dintre cataliza enzimatică și cataliza chimică se va reduce, pe de o parte datorită obținerii unor enzime mai bine adaptate condițiilor industriale, iar pe de altă parte datorită obținerii unor catalizatori sintetici (sinzime) care să imite principiul acțiunii enzimelor.

Numărul total al proceselor de biotransformare aplicate la scală industrială a crescut foarte rapid în ultimii zece ani și se așteaptă ca această creștere să fie și mai pronunțată în continuare. Informațiile accesibile public despre aceste procese sunt însă de multe ori incomplete sau contradictorii și sunt unele despre care nu există nici un fel de date concrete.

Pentru a putea fi considerate procese de biotransformare aplicate industrial, ele trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- să fie procese în care un substrat anumit este convertit printr-o reacție sau o serie de reacții în produsul dorit prin biotransformare și nu procese

fermentative propriu-zise de formare a unui metabolit pe baza unei surse de carbon şi energie.

- biotransformarea să fie realizată utilizând enzime, celule întregi, sau combinaţii ale acestora, în stare liberă sau imobilizată.
- produsul de reacţie să fie un produs de sinteză organică fină sau unul de largă folosinţă care să poată fi separat după terminarea reacţiei.
- procesul să fie exploatat la scală industrială sau cel puţin anunţat a fi operabil la un nivel de peste 100 kg/an.

6.1. Realizări şi tendinţe în biocataliza industrială

Un studiu făcut pe un număr de 134 procese aplicate industrial în anul 2001 (Straathof, Panke şi Schmid, 2002) a relevat principalele tendinţe existente la ora actuală în acest domeniu. Valorile care vor fi prezentate se referă la numărul de procese aplicate, dar nu ţin cont şi de nivelul producţiei compuşilor respectivi, deoarece aceste date sunt de multe ori inexacte sau nu se cunosc. Biotransformările industriale sunt legate în special de produşi naturali sau derivaţi ai acestora, dar nu există o clasă de compuşi care să fie predominantă în aplicaţiile existente. Hidraţii de carbon şi derivaţii de grăsimi sunt utilizaţi în aplicaţiile din sectorul alimentar, în timp ce alte clase de compuşi sunt la baza aplicaţiilor din sectoarele farmaceutic şi agricol (Figura 6.1).

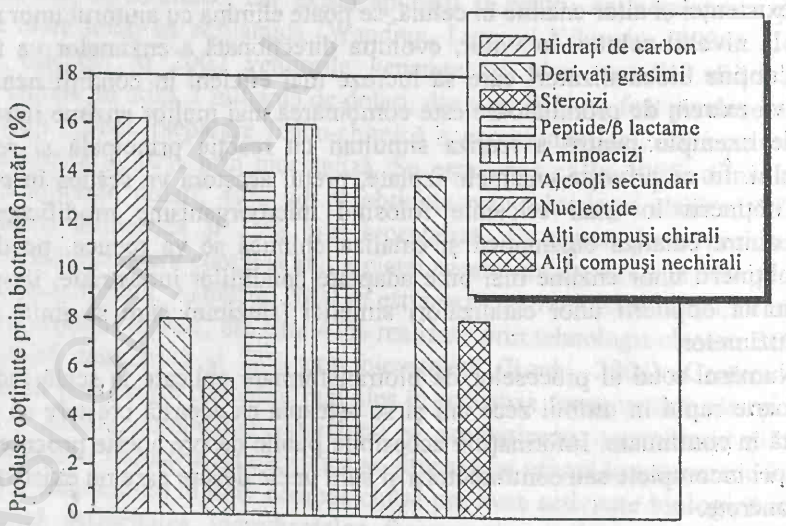


Figura 6.1. Principalele clase de compuşi care se fabrică prin biotransformări industriale

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În ce privește domeniile de utilizare, aplicațiile din sectorul farmaceutic sunt predominante (Figura 6.2).

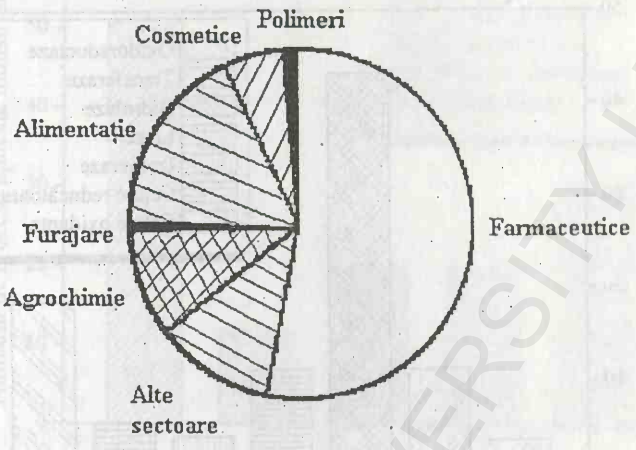


Figura 6.2. Principalele domenii în care se utilizează biotransformări industriale

Dacă se ține însă cont și de nivelul producției, alte sectoare devin mai importante, întrucât nici unul dintre produsele fabricate la nivel de peste 20.000 t/an nu este din sectorul farmaceutic, ele fiind în majoritate hidrați de carbon. Faptul că numărul produselor de mare tonaj este destul de redus demonstrează faptul că biotransformările sunt aplicate mai ales în industria de sinteză organică fină.

În mod cert, activitatea optică este un factor cheie în biotransformările industriale. În mod oarecum surprinzător însă, într-un număr destul de mare de procese se pleacă de la o materie primă optic activă. Atunci când activitatea optică apare în timpul biotransformării, tipul de reacție este fie rezoluția optică fie sinteza asimetrică. Sintezele asimetrice sunt realizate mai ales cu oxidoreductaze și liaze, în timp ce rezoluțiile cinetice sunt realizate aproape exclusiv cu ajutorul hidrolazelor. În aproximativ un sfert din numărul acestor rezoluții cinetice hidrolazele sunt utilizate pentru reacții de hidroliză, restul fiind reacții de sinteză.

Majoritatea reacțiilor biocatalitice prezentate în literatura de specialitate sunt catalizate de hidrolaze, doar aproximativ un sfert dintre acestea având ca obiect oxidoreductaze și 15% alte categorii de enzime. În ce privește reacțiile industrializate (Figura 6.3), nu există o dominație atât de pronunțată a hidrolazelor (ponderea lor numerică este de 43%), întrucât și reacțiile catalizate de liaze și transferaze sunt destul de numeroase, iar numărul de procese în care sunt prezente biotransformări de oxidoreducere este și mai însemnat. Dintre procesele de oxidoreducere, unele utilizează două oxidoreductaze, una pentru realizarea biotransformării și una pentru regenerarea cofactorului. Majoritatea biotransformărilor de oxidoreducere sunt realizate cu celule

întregi care au activitate metabolică şi în care împreună cu oxidoreductazele coexistă o serie de alte enzime din toate clasele.

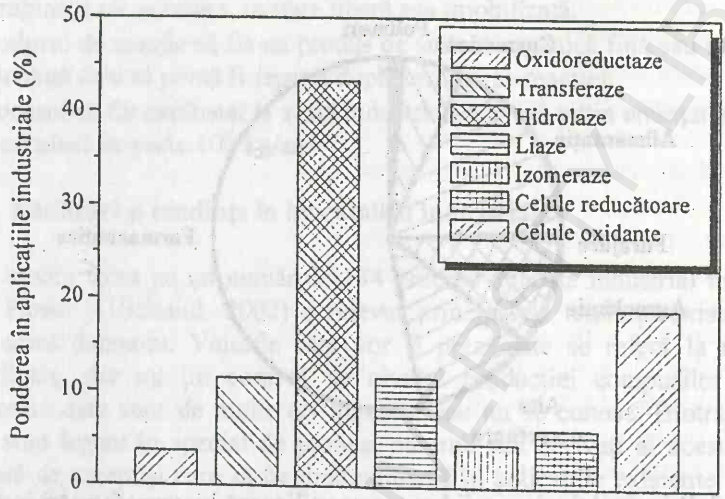


Figura 6.3. Ponderea numerică a diferitelor clase de enzime în procesele de biotransformare industriale

Celulele întregi sunt folosite şi în numeroase procese care nu implică reacţii de oxidoreducere. În aceste cazuri produşii de reacţie nu sunt metaboliţi ai microorganismului respectiv şi în general doar o singură enzimă este activă în procesul de biotransformare. Celulele întregi sunt folosite într-un număr mai mare de cazuri decât enzimele izolate (Figura 6.4). În cazul folosirii de celule, tehnica imobilizării este aplicată mai puţin decât în cazul enzimelor izolate din culturi. Explicaţia acestui fapt rezidă în utilizarea de celule întregi mai ales pentru biotransformări de oxidoreducere, situaţie în care este necesară asigurarea de oxigen pentru menţinerea activităţii metabolice a celulei. În această situaţie imobilizarea nu este recomandată, deoarece ar îngreuna difuzia oxigenului spre celulă.

Informaţiile privind reactoarele utilizate pentru realizarea biotransformărilor în general sunt date incomplet sau lipsesc în totalitate, din motive de protecţie a tehnologiei aplicate. Când se utilizează enzime imobilizate, reactoarele în regim continuu sunt mai frecvent folosite. În majoritatea aplicaţiilor însă se folosesc reactoare în regim discontinuu, în special în cazul proceselor la un tonaj mai redus. Reactoarele cu membrană se utilizează doar într-un număr redus de aplicaţii.

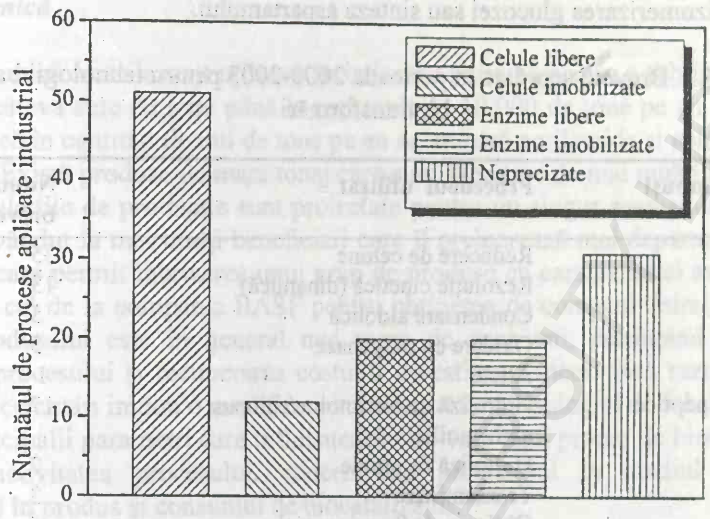


Figura 6.4. Utilizarea celulelor și enzimelor libere în biotransformări industriale

Deși reacțiile enzimatice în solvenți organici neapoși reprezintă un domeniu prioritar al cercetării, nu există decât un mic număr de asemenea procese aplicate la nivel industrial (în jur de 10), ele fiind reacții de esterificare, transesterificare și amidare. Mult mai răspândite sunt procesele în care există un solvent organic adăugat la o fază apoasă, formând un mediu de reacție monofazic sau bifazic. Din această categorie fac parte și procesele în care faza organică este unul dintre reactanții sau produșii reacției. Există și o categorie de reacții în sisteme multifazice în care unul dintre reactanți sau produși este solid și nu lichid. Există cel puțin 13 reacții aplicate industrial în care se lucrează cu suspensii apoase, în majoritatea cazurilor o suspensie apoasă a substratului fiind convertită într-o suspensie apoasă a produsului.

O măsură a interesului crescător față de domeniul biocatalizei și aplicarea industrială a rezultatelor cercetării este și numărul brevetelor de invenție acordate diferitelor companii și care acoperă domeniile farmaceutic, de sinteză fină, al aromelor și odoranților (Panke, Held și Wubbolts, 2004). Au fost identificate un număr de 205 brevete acordate începând din anul 2000, care pot fi considerate semnificative pentru domeniul investigat (Tabelul 6.1).

În cele ce urmează vor fi analizate unele caracteristici generale ale proceselor de biotransformare aplicate în industria chimică și farmaceutică, urmând ca detalii privind aceste procese să fie prezentate în subcapitolele referitoare la clasele de enzime corespunzătoare. Procesele din industria alimentară care utilizează cataliza enzimatică se referă mai ales la transformările unor polizaharide (hidroliza amidonului, pectinelor, etc.) și ele nu vor fi prezentate în acest capitol. Excepție fac acele procese care pot fi

considerate de natură chimică, deşi beneficiarul lor principal este industria alimentară, de exemplu izomerizarea glucozei sau sinteza aspartamului.

Tabelul 6.1. Brevete acordate în perioada 2000-2003 pentru tehnologii bazate pe biotransformări

Clasa de compuşi	Procedeul utilizat	Numărul de brevete
Alcooli	Reducere de cetone	35*
	Rezoluţie cinetică (dinamică)	13
	Condensare aldolică	5
	Oxidare cu oxigenaze	3
	Altele	1
Aminoacizi/peptide	Hidroliză de hidantoine/compuşi carbamoilici	17
	Hidroliză de amide	7
	Transaminare	3
	Obţinere de β-aminoacizi	5
	Sinteză de peptide prin cuplare cinetică	8
	Altele	1
Acizi	Rezoluţia esterilor	14
	Hidroliză de nitrili/cianhidrine	5
	Oxidare cu oxigenaze	4
	Acizi prin reacţii catalizate de liaze	3
	Rezoluţia amidelor	2
	Altele	1
Zaharuri	Oligozaharide cu glicoziltransferaze	10
	Remodelare glicoproteine	9
	Activare monozaharide	3
	Altele	1
Produse naturale complexe	Antibiotice	9
	Steroizi	5
	Modificarea altor molecule complexe	2
Epoxizi/peroxizi/dioli		9
Amine		9
Aldehide		6
Cianhidrine		6
Altele		5

*din care 9 brevete se ocupă mai ales cu regenerarea cofactorilor

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Caracteristici generale ale proceselor de biotransformare din industria chimică

Biotransformările sunt utilizate în industria chimică pentru a fabrica produse la nivel de la câteva sute de tone până la mai mult de 10.000 de tone pe an. Printre cele care se fabrică în cantități de mii de tone pe an se numără acrilamida și acidul 6-amino-penicilanic. Există produse de mare tonaj care sunt fabricate de mai multe companii. În general instalațiile de producție sunt proiectate pentru un singur asemenea produs, iar acesta este vândut la mai mulți beneficiari care îl prelucrează mai departe. Există însă și instalații care permit fabricarea unui grup de produse cu caracteristici asemănătoare, de exemplu cel de la compania BASF pentru obținerea de compuși chirali. Timpul de viață al produsului este în general mai mare de zece ani, permițând optimizarea continuă a procesului și recuperarea costului investiției. Uneori însă rezultatele celor mai recente cercetări impun o modificare substanțială a tehnologiei de fabricație.

Principalii parametri care influențează eficiența unui proces de biotransformare sunt: productivitatea procesului, concentrația produsului în mediul de reacție, randamentul în produs și consumul de biocatalizator.

Dintr-un număr de 134 de procese de biotransformări aplicate la scală industrială care au fost analizate (Straathof, Panke și Schmid, 2002), un număr de 64 au fost cele în care producția anuală este de peste o tonă și produsul este utilizat cu precădere în industria chimică sau ca materie primă în industria farmaceutică. Valorile medii ale principalilor parametri de eficiență pentru aceste procese sunt date în Tabelul 6.2.

Pentru majoritatea proceselor pentru care au existat date accesibile, concentrația produsului final în mediul de reacție a fost mai mare de 50 g/l, iar în cazul hidraților de carbon și amidelor chiar a depășit 200 g/l. Excepția o constituie fabricarea epoxizilor, unde stabilitatea redusă a produsului a dus la necesitatea utilizării unei tehnici eficiente de îndepărtare a acestuia din mediul de reacție pe măsura formării sale. Datele acestea infirmă prejudecata conform căreia unul dintre dezavantajele proceselor biocatalitice este concentrația redusă de produs din mediul de reacție și cheltuielile mari care ar rezulta implicit pentru separarea acestuia.

Productivitatea medie a proceselor biocatalitice industriale se situează în general mult peste 1 g/l·h, iar în cazul aminoacizilor și amidelor au fost raportate chiar valori mai mari de 80 g/l·h. În ce privește randamentele proceselor, ele se situează în general peste 80% și de multe ori peste 90%. Excepție fac rezoluțiile cinetice, unde conversia maximă este de 50%, însă și în aceste situații au fost găsite soluții eficiente pentru valorificarea și a izomerului inactiv, mai ales prin racemizare, așa cum se va arăta în continuare.

Un parametru important în cazul reacțiilor biocatalitice este consumul de catalizator, întrucât costul acestuia este în general ridicat. Datele în această privință sunt foarte puține, însă se poate aprecia că valorile uzuale pentru catalizatorii chimici, de 100-10.000 kg produs la 1 kg catalizator sunt atinse doar în puține cazuri de biocatalizatori, mai ales atunci când se utilizează enzime sau celule imobilizate.

Tabelul 6.2. Principalii parametri de eficiență ai biotransformărilor din industria chimică

Clasa de compuși	Biocatalizator	Productivitate medie* (g/l·h)	Concentrația produsului* (g/l)	Randament mediu (%)
Aminoacizi	Decarboxilază, aspartază, oxidoreductaze, amidaze, liază (enzime izolate și celule)	54,6 (5)	102 (14)	82
Alcooli	Lipaze, oxidoreductază, fumarază, kinază (enzime izolate și celule)	4,2 (7)	107 (14)	88
Hidrați de carbon	Transferază, amilaze, aldolaze (enzime izolate)	3 (1)	237 (4)	90
β-Lactame	Amidaze, acilaze, oxidază, lipază, peptidaze (enzime izolate)	18,5 (1)	87 (9)	94
Nucleotide	Lactamază, deaminază (celule)	-	65 (2)	47
Acizi	Lipaze, esteraze, amidaze, hidroxilaze, oxigenază (enzime izolate și celule)	1,7 (4)	108 (7)	81
Epoxizi	Oxigenază (celule)	1 (1)	7 (1)	90
Compuși aromatici hidroxilici	Hidroxilaze (celule)	1,4 (3)	59 (5)	72
Amine	Lipază, oxidoreductază (enzime izolate și celule)	12,8 (1)	80 (4)	43,5
Amide	Hidratază, oxidoreductaze (celule)	42 (2)	225 (4)	96
Total		15,5 (25)	108 (64)	78

*în paranteză s-a trecut numărul proceselor pentru care au existat date ce au permis calcularea parametrului respectiv

Caracteristici generale ale proceselor de biotransformare din industria farmaceutică

O parte dintre companiile farmaceutice au dezvoltat, mai ales în ultimii 15 ani, procese chemoenzimatice pentru obținerea unor produse farmaceutice în care cel puțin o etapă este biocatalitică. Aceste procese au fost operate la nivele de la 1 kg până la sute de kg, dar de multe ori scopul lor principal a fost doar de a asigura o anumită cantitate din produsul respectiv pentru un scop bine determinat, de exemplu faza de testări clinice. Enzimele utilizate pentru aceste procese au fost enzime comerciale, existând doar rareori tendința de a produce noi biocatalizatori specifici scopului

urmărit. În aceste condiții productivitatea, concentrația produsului în masa de reacție și randamentele în produs au fost mai mici decât în cazul proceselor operate de companiile chimice. În cazul produselor farmaceutice, costul producției devine un factor important doar în faza finală când produsul respectiv este pe punctul de fi lansat pe piață și trebuie fabricat în cantități industriale.

În Tabelul 6.3 sunt prezentate câteva exemple de procese biocatalitice aplicate în industria farmaceutică. Toate produsele astfel obținute sunt optic active, excesul enantiomeric fiind în toate cazurile mai mare de 98%.

Tabelul 6.3. Reacții de biotransformare aplicate în companii farmaceutice

Produsul	Compania	Tipul reacției	Biocatalizator	Scală (kg)	Randament (%)
SCH56592	Schering Plough	Acilare	*Candida antarctica* lipase B	> 30	30
Lotrafiban	Glaxo Smith Kline	Hidroliză	*Candida antarctica* lipase B	>100	45
Paclitaxel	Bristol-Myers Sqiubb	Hidroliză	Lipază AK din *Pseudomonas* sp.	> 1	45
SCH 66336	Schering Plough	Acilare	Lipază din *Pseudomonas aeruginosa*	25	47
Xemilofiban	Monsanto	Hidroliză	Acilază din *Escherichia coli*	8	43
Inhibitor de renină	Hoffmann La Roche	Hidroliză	Subtilizină din *Bacillus licheniformis*	7	43
Lamivudin	Glaxo Smith Kline	Hidroliză	Citidin deaminază din *Escherichia coli*	> 1	50
Omapatrilat	Bristol-Myers Sqiubb	Deaminare reductivă	Fenilalanin dehidrogenază din *T. intermedius*	200	91

Exceptând ultimul exemplu, toate aceste procese se bazează pe rezoluții cinetice, de aceea randamentele sunt mai mici de 50%.

Trebuie menționat faptul că alături de companiile chimice și cele farmaceutice propriu-zise există și o serie de întreprinderi care fabrică intermediari farmaceutici la comandă. Aceste întreprinderi se găsesc într-o competiție continuă cu alți producători care urmăresc să sintetizeze aceeași moleculă, iar datele referitoare la producția realizată și tehnologiile folosite sunt și mai puțin accesibile decât în cazul marilor companii.

6.2. Reacţii catalizate de oxidoreductaze

Din punct de vedere istoric, prima utilizare industrială a unui proces de biocataliză ce utiliza celule ce pot fi considerate imobilizate a fost fabricarea oţetului din alcool etilic în 1823, sub acţiunea bacteriilor acetice fixate pe talaş de stejar. De atunci, chiar dacă au fost depăşite în importanţă de hidrolaze, cele peste 700 de oxidoreductaze care au fost identificate până acum reprezintă o clasă de enzime cu remarcabil potenţial aplicativ în biocataliza industrială. Trebuie menţionat că până şi procedeul clasic de oxidare a alcoolului etilic la acid acetic suferă îmbunătăţiri continue, recent fiind menţionată aplicarea industrială a unui nou procedeu ce foloseşte celule imobilizate de *Acetobacter suboxidans*, la compania japoneză Kewpie Jyozo (Shibatani, 1996).

Biocataliza reprezintă o posibilitate extrem de avantajoasă pentru realizarea reacţiilor de oxidoreducere regio- sau enantioselective. Oxidoreductazele sunt frecvent folosite pentru a converti compuşi prochirali în produşi chirali, cu selectivitate ridicată. O problemă importantă este regenerarea cofactorilor, care a fost rezolvată fie prin utilizarea de celule întregi drept biocatalizatori, fie prin regenerarea în paralel a cofactorului, utilizând o reacţie complementară. Regenerarea se poate face fără probleme de 100.000 sau chiar mai multe ori, reducându-se astfel drastic ponderea preţului destul de ridicat al cofactorului în costul produsului. Alături de necesitatea regenerării, un alt factor limitativ al utilizării proceselor ce necesită cofactori este inabilitatea cunoscută a acestora de a lucra în alte medii decât cele diluate apoase. Această problemă poate fi rezolvată fie prin utilizarea unor reactoare cu membrană, fie prin imobilizarea enzimei cu cofactorul prezent în centrul activ. O asemenea imobilizare se poate realiza de exemplu în cazul cristalelor de enzime înreţelate, cofactorul imobilizat fiind activ şi în mediu organic (West, 1996).

În cazul reacţiilor de biotransformare care se realizează folosind celule întregi, în mod frecvent procesul implică mai multe etape, care se realizează cu enzime diferite. Aceste procese sunt încadrate tradiţional în categoria proceselor fermentative. În acest capitol vor fi prezentate câteva exemple de asemenea procese, în care s-a considerat că reacţia principală este cea de oxidoreducere.

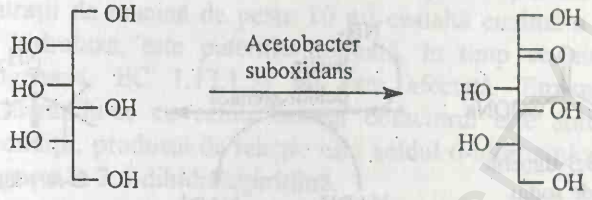
Există şi o serie de alte procese aplicate industrial în care se utilizează oxidoreductaze conţinute în celule întregi de microorganisme dar detaliile de producţie nu au fost accesibile, de exemplu reacţiile in care se obţin steroizi:

- obţinerea 11-α-hidroxi-progesteronei din progesteronă prin hidroxilare;
- obţinerea prednisolonei din hidrocortizonă prin dehidrogenare;
- obţinerea prednisonei din cortizonă prin dehidrogenare.

6.2.1. Oxidarea D-sorbitolului la L-sorboză

Transformarea unor substraturi din clasa hidraţilor de carbon cu ajutorul unor celule de microorganisme reprezintă un domeniu cu mari perspective. Exemplul cel mai elocvent îl constituie oxidarea D-sorbitolului la L-sorboză, care reprezintă una

dintre etapele fabricării vitaminei C. D-Sorbitolul se obține din D-glucoză prin reducere pe cale chimică. Oxidarea sorbitolului la sorboză are loc sub acțiunea celulelor întregi de *Acetobacter suboxidans*, care produc o enzimă numită D-sorbitol dehidrogenază (EC 1.1.99.21), care necesită NAD^+ drept cofactor, iar regenerarea cofactorului are loc în interiorul celulei (West, 1996).



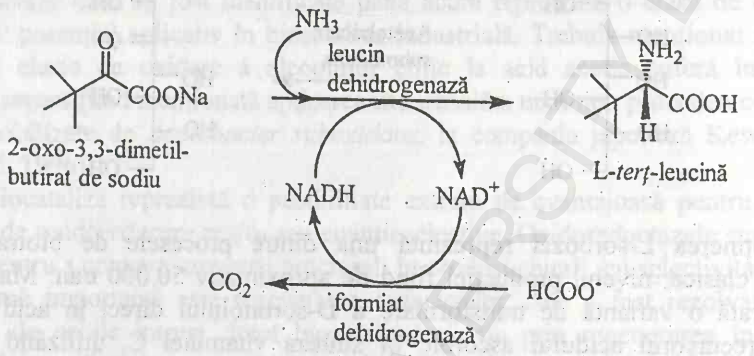
Obținerea L-sorbozei reprezintă una dintre procesele de biotransformare industriale clasice, nivelul producției fiind de aproximativ 50.000 t/an. Mai recent, a fost elaborată o variantă de transformare a D-sorbitolului direct în acid 2-ceto-L-gulonic, precursorul acidului ascorbic în sinteza vitaminei C, utilizând o tulpină recombinată de *Gluconobacter oxydans* care conține toate cele trei enzime oxidative necesare pentru realizarea acestui proces. Randamentul global este de peste 80% iar concentrația substratului în mediul de reacție inițial 150 g/l (Holland, 1998).

6.2.2. Aminarea reductivă enantioselectivă a α-cetoacizilor la L-aminoacizi

Una dintre aplicațiile importante ale oxidoreductazelor constă în aminarea reductivă a α-cetoacizilor la L-aminoacizi. Dezavantajul metodei este, ca și în cazul altor procese catalizate de oxidoreductaze, dependența de cofactor. Această variantă a fost aplicată pentru sinteza L-alaninei pornindu-se de la acid L-lactic, care mai întâi s-a oxidat la piruvat, folosind L-lactat dehidrogenaza (E.C. 1.1.1.27) din *Lactobacillus* sp. în prezență de nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD). Piruvatul s-a supus în continuare aminării reductive cu amoniac, în prezența alanin dehidrogenazei (E.C. 1.4.1.1) din *Bacillus cereus* și a cofactorului NADH, obținându-se L-alanina (Wandrey, Kula și Leuchtenberger, 1984). Metoda se poate aplica pentru sinteza mai multor L-aminoacizi (L-metionină, L-valină, L-fenilalanină), însă nu a putut concura din punct de vedere economic cu alte procedee enzimatice.

În principiu, obținerea aminoacizilor se poate face ușor pe cale biocatalitică prin aminarea reductivă a cetoacizilor corespunzători. În practică însă apare problema că hidrogenul necesar reducerii enzimatice trebuie asigurat de către un cofactor, care este NADH, cofactor prea scump pentru fi utilizat doar o singură dată. Realizarea procesului în condiții economice este strâns legată de regenerarea cofactorului. Această problemă a fost rezolvată la compania Degussa-Hülls cu ajutorul unei alte enzime, formiat dehidrogenaza izolată dintr-o drojdie, care degradează acidul formic într-o altă reacție cuplată cu reacția principală, formând bioxid de carbon și regenerând NADH.

Ei au utilizat leucin dehidrogenaza (E.C. 1.4.1.9) pentru fabricarea L-*terț*-leucinei, proces exploatat la ora actuală la scală industrială la nivel de tone, cu regenerarea concomitentă a cofactorului folosind formiat dehidrogenaza (E.C. 1.2.1.2). L-*terț*-leucina este un aminoacid nenatural utilizat drept intermediar chiral în sinteze asimetrice și este parte componentă a unor inhibitori ai HIV-proteazelor (Schulze și Wubbolts, 1999).



Amestecul de reacție pentru sinteza L-terț-leucinei conține acid 2-oxo-3,3-dimetilbutiric (acid trimetilpiruvic) sub formă de sare de sodiu și formiat de amoniu, în mediu apos. pH-ul se aduce la 8,5 cu soluție concentrată de amoniac și se introduc enzimele, leucin dehidrogenaza obținută dintr-o specie de *Bacillus* și formiat dehidrogenaza din drojdia *Candida boidinii*. După terminarea reacției enzimele se recuperează prin ultrafiltare cu randamente satisfăcătoare, 99% în cazul leucin dehidrogenazei și 70% în cazul formiat dehidrogenazei. Randamentul de obținere al produsului este în jur de 85%, iar puritatea optică a acestuia este foarte ridicată, de peste 99,9%. Acesta a fost primul proces biocatalitic în care s-a demonstrat că necesitatea utilizării unui cofactor nu reprezintă un impediment major, nici în ce privește complexitatea procesului nici în privința costurilor (Krix ș.a., 1997).

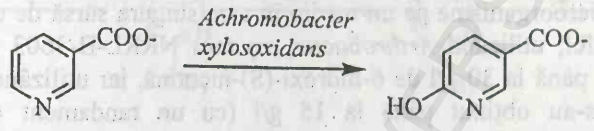
6.2.3. Reacții de hidroxilare regioselective ale compușilor aromatici

Importante aplicații industriale ale oxidoreductazelor se bazează pe regioselectivitatea reacțiilor catalizate de aceste enzime. Compania elvețiană Lonza, specializată și în producția de heterocicli cu azot, a dezvoltat o serie de procese biocatalitice pentru a obține anumiți compuși heterociclici funcționalizați a căror sinteză chimică s-a dovedit a fi ineficientă. Printre aceste procese se numără (Schmid ș.a., 2001):

- hidroxilarea selectivă în nucleu a compușilor heterociclici aromatici cu azot ;
- oxidarea selectivă a grupărilor alchilice ale compușilor heterociclici aromatici cu azot.

Acidul 6-hidroxinicotinic reprezintă un intermediar important, mai ales pentru sinteza unor insecticide moderne. El se poate obține pornind de la acid nicotinic

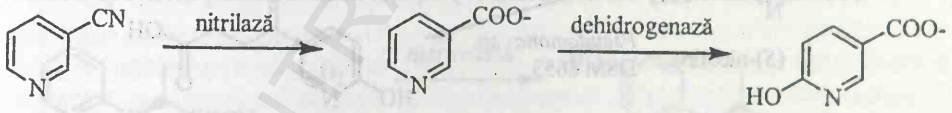
(niacină), însă introducerea unui substituent în poziția 6 a moleculei de niacină pe cale chimică determină formarea de produși secundari și creșterea prețului produsului. Cercetările din cadrul companiei Lonza au dus la identificarea unui microorganism din specia *Achromobacter xylosoxidans*, care se dezvoltă într-un mediu conținând niacină și determină formarea acidului 6-hidroxinicotinic în concentrație de până la 65 g/l, la un randament global de transformare de 90%. Un alt aspect important este faptul că în cazul unor concentrații de niacină de peste 10 g/l cealaltă enzimă a căii metabolice, 6-hidroxinicotinat hidrolaza, este puternic inhibată, în timp ce niacin hidroxilaza (nicotinat dehidrogenaza, EC 1.17.1.5) nu este afectată. Enzima este $NADP^+$ dependentă, însă lucrându-se cu celule întregi cofactorul este automat prezent în sistem. În aceste condiții, produsul de reacție este acidul 6-hidroxinicotinic, el nefiind transformat mai departe în 2,6-dihidroxipiridină.



niacină — acid 6-hidroxi-nicotinic

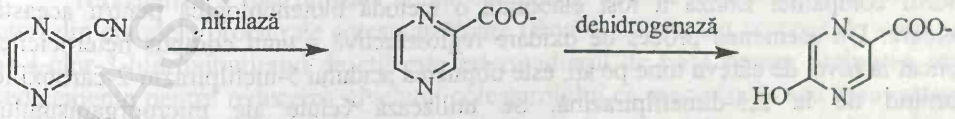
Pentru obținerea acidului 5-hidroxi-pirazincarboxilic pornind de la 2-cianopirazină se utilizează celule întregi de *Agrobacterium* DSM 6336. Acest acid este intermediar pentru obținerea unor medicamente antituberculoase (esteri ai acidului 5-clorpirazin-2-carboxilic).

Faza de creștere a microorganismului *Agrobacterium* DSM 6336



3-cianopiridină — acid nicotinic — acid 6-hidroxi-nicotinic

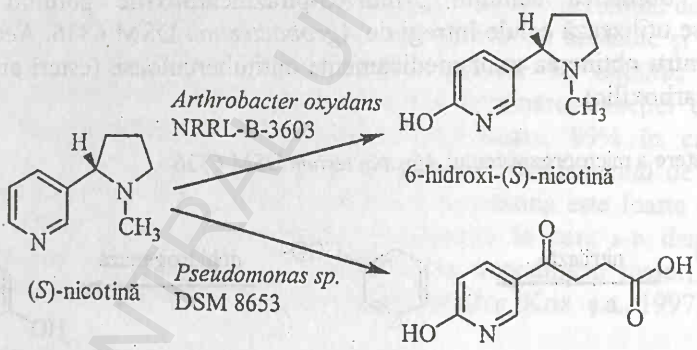
Faza de biotransformare



2-cianopirazină — acid 2-pirazin-carboxilic — acid 5-hidroxi-2-pirazin carboxilic

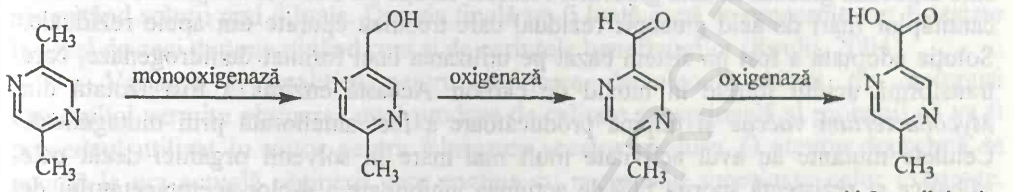
Au loc două reacţii biocatalitice: hidroliza grupării nitrilice a 2-cianopirazinei la acid pirazin-2-carboxilic, care apoi este hidroxilat regioselectiv la acid 5-hidroxi-pirazin-2-carboxilic sub acţiunea aceloraşi celule bacteriene. Concentraţia produsului în mediu a atins 40 g/l. Pentru a se stimula producerea enzimelor necesare (nitrilaza şi dehidrogenaza), microorganismul a fost crescut mai întâi pe un mediu conţinând 3-cianopiridină ca sursă de carbon şi energie.

Într-un alt proces se utilizează ca materie primă (*S*)-nicotina, obţinută din frunze de tutun (în care se găseşte în concentraţii între 2-8%), pentru sinteza biocatalitică a unor piridine funcţionalizate. Acestea sunt intermediari în sinteza unor medicamente ca epibatidina, un analgezic foarte eficient. Funcţionalizarea selectivă a nicotinei la nucleul piridinic sau pirolidonic prin metode chimice este foarte greu de controlat. Prin biotransformări a fost posibilă obţinerea unor metaboliţi ai nicotinei prin cultivarea unor microorganisme pe un mediu în care singura sursă de carbon şi azot a fost nicotina. Astfel, utilizând *Arthrobacter oxydans* NRRL-B-3603 s-au obţinut în mediul de cultură până la 30 g/l de 6-hidroxi-(S)-nicotină, iar utilizând *Pseudomonas sp.* DSM 8653 s-au obţinut până la 15 g/l (cu un randament de 51%) 4-(6-hidroxipiridin-3-il)4-oxobutirat. Ambii aceşti intermediari pot fi transformaţi pe cale chimică în epibatidină.



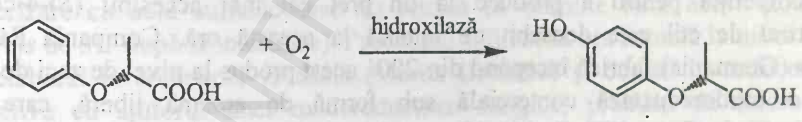
Obţinerea la scală industrială a acizilor heretociclici aromatici prin oxidarea chimică a unor compuşi heterociclici aromatici având una sau mai multe grupări metil este în general nespecifică şi duce la obţinerea unor produse secundare nedorite. În cadrul companiei Lonza a fost elaborată o metodă biotehnologică pentru această oxidare. Un asemenea proces de oxidare regioselectivă a unui compus heterociclic, aplicat la nivel de câteva tone pe an, este obţinerea acidului 5-metilpirazin-2-carboxilic pornind de la 2,5-dimetilpirazină. Se utilizează celule ale microorganismului *Pseudomonas putida* ATCC 33015, dezvoltate pe un mediu care conţine drept unică sursă de carbon şi energie p-xilenul, care produc o monooxigenază şi două dehidrogenaze ce realizează biotransformările necesare. S-a demonstrat că acest

microorganism, după ce a fost crescut pe un mediu de p-xilen, este capabil să oxideze la acizii corespunzători o serie de compuși metilați ciclici cu 5 sau 6 atomi în ciclu, fără a avea loc în paralel reacții de decarboxilare sau hidroxilare. Materia primă pentru această oxidare este 2,5-dimetilpirazina, substratul pentru dezvoltarea microorganismului în fermentatorul industrial fiind un amestec de 75% p-xilen și 25% 2,5-dimetilpirazină. S-au obținut concentrații de produs și randamente ridicate, după 54 de ore concentrația de acid 5-metilpirazin-2-carboxilic în mediul de cultură fiind de până la 20 g/l. Acidul 5-metilpirazin-2-carboxilic este intermediarul de bază pentru obținerea unui medicament antilipolitic.



2,5-dimetil-pirazină — acid 5-metilpirazin-2-carboxilic

Un alt proces care are la bază o reacție de hidroxilare în nucleul aromatic este obținerea acidului (R)-2-(4-hidroxifenoxi)-propionic, produs utilizat la sinteza unor compuși agrochimici (ierbicide). Acest proces este exploatat la compania BASF și microorganismul folosit este *Beauvaria bassiana*. S-a realizat hidroxilarea regioselectivă a acidului (*R*)-2-fenoxipropionic la acidul (*R*)-2-(4'-hidroxi)-fenoxipropionic folosind celule întregi de *Beauveria bassiana* (fungi), care produc o hidroxilază specifică pentru această reacție (Wandrey, Liese și Kihumbu, 2000).



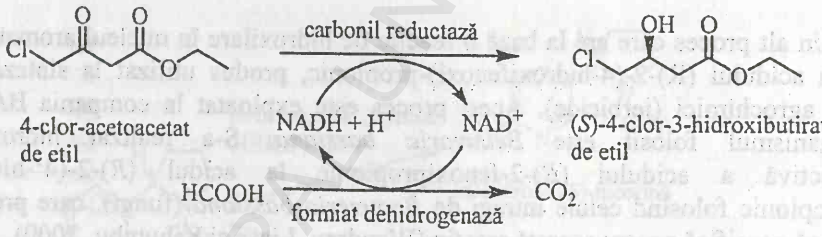
Acid (*R*)-2-fenoxipropionic — Acid (R)-2-(4'-hidroxi)-fenoxipropionic

6.2.4. Alcooli chirali prin reducerea enantioselectivă a cetonelor

Biocataliza a fost utilizată cu succes pentru sinteza 3-hidroxibutiraților optic activi din cetonele prochirale corespunzătoare (Rouhi, 2004). Un compus de acest tip, (*S*)-4-clor-3-hidroxibutiratul de etil este intermediarul de bază pentru obținerea unor medicamente pentru reducerea nivelului colesterolului ca atorvastatin sau rosuvastatin. Un medicament (Lipitor) care are ca substanță activă atorvastatin a avut cele mai mari vânzări în lume în 2003, cifrate la 10,3 miliarde de dolari.

Există o serie de producători care oferă (*S*)-4-clor-3-hidroxibutirat de etil obținut pe cale biocatalitică. Astfel, compania Daicel Chemical Industries (Japonia) are

o capacitate de producție de peste 100 tone pe an, folosind o tehnologie bazată pe hidrogenarea asimetrică a grupării carbonil din 4-clor-acetoacetatul de etil, folosind celule întregi ca biocatalizator. Enzima care catalizează această transformare este o carbonil reductază (3-hidroxibutirat dehidrogenază, EC 1.1.1.30), produsă inițial de microorganismul *Kluyveromyces aestuarii*, care a fost clonată și exprimată în *Escherichia coli*. 4-Clor-acetotacetatul de etil se obține pe cale chimică, pornind de la o dicetenă. Sursa de hidrogen o reprezintă nicotinamid-adenin-dinucleotidul în formă redusă (NADH). Problema care apare și în acest caz este regenerarea cofactorului, care inițial a fost realizată printr-o reacție complementară catalizată de o glucozoxidază, care oxidează glucoza la acid gluconic. Această soluție nu a fost însă agreată din cauza cantităților mari de acid gluconic rezidual care trebuiau epurate din apele reziduale. Soluția adoptată a fost un sistem bazat pe utilizarea unei formiat dehidrogenaze, care transformă acidul formic în bioxid de carbon. Această enzimă a fost izolată din *Mycobacterium vaccae* și tulpina producătoare a fost ameliorată prin mutageneză. Celulele mutante au avut activitate mult mai mare în solvenți organici decât cele sălbatice și rezistență sporită față de acțiunea inhibitoare a 4-clor-acetotacetatului de etil. În aceste condiții, (*S*)-4-clor-3-hidroxibutiratul de etil se obține cu o puritate enantiomerică de peste 99% și la o concentrație în mediul de reacție de 49,9 g/l.



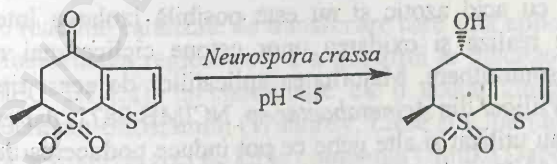
Competiția pentru a produce la un preț cât mai accesibil (*S*)-4-clor-3-hidroxibutirat de etil este deosebit de intensă la această oră. Compania Rütgers Chemicals (Germania) fabrică începând din 2001 acest produs la nivel de zeci de tone, folosind o oxidoreductază comercială sub formă de enzimă liberă, care este comercializată de firma IEP GmbH (Germania). Se lucrează în sistem bifazic apă-solvent organic, iar excesul enantiomeric al produsului este de peste 99,9%. Aceaste oxidoreductaze au avantajul că sunt foarte ieftine și drept urmare nu este necesară refolosirea lor. Operarea procesului este de asemenea foarte simplă, fiind necesar doar un reactor cu agitare obișnuit. Recent, folosind aceeași tehnologie, Rütgers Chemicals a început fabricarea (*S*)-2-butanolului din 2-butanonă, la nivel de tone. (Gupta și Ertl, 2004)

O altă companie care este pe cale de a elabora o tehnologie enzimatică industrială în acest sens este Dowpharma. Ei utilizează un procedeu bazat pe o nitrilază, dar deocamdată nu sunt accesibile detalii despre acest proiect. Alte companii, de exemplu Chiral Quest (S.U.A.) sau Bayer Chemicals (Germania) au optat pentru o variantă chimică de hidrogenare enantioselectivă, folosind catalizatori eterogeni pe

bază de ruteniu. Wacker Industries (Germania) a pus la punct o tehnologie de obținere a 3-hidroxibutiraților optic activi folosind o alcool dehidrogenază din *Lactobacillus brevis*, enzimă care este comercializată de Juelich Fine Chemicals (Germania). Această tehnologie a fost experimentată la nivel de sute de kg și a dus la obținerea unui randament de 97% și purități enantiomerice a produsului de 100%. Cu toate acestea, ei consideră că varianta chemocatalitică de hidrogenare enantioselectivă va fi mai avantajoasă deși lucrează la o temperatură mai mare (100°C), necesită manipularea hidrogenului care este exploziv și a metanolului care este un solvent toxic. Prețul final al produsului este însă mai mic cu 10-15% decât în varianta biocatalitică iar cantitatea de ape reziduale produsă este de aproximativ 5 ori mai mică, procesul biocatalitic necesitând soluții mai diluate. Decizia finală va fi luată după ce procesele vor fi testate la nivel de zeci de tone, ținând cont și de cerințele beneficiarilor (Rouhi, 2004).

Varianta biocatalitică pentru obținerea de alcooli chirali din compuși carbonilici permite obținerea unor produse de calitate excepțională și probabil că va fi procedeul utilizat în viitor pentru fabricarea acestor produse. O atenție deosebită se acordă la ora actuală obținerii unor enzime cu proprietăți superioare celor existente. Companiile interesate în acest domeniu fie au dezvoltat o cercetare proprie in acest sens, fie colaborează cu firme specializate, cum ar fi Prokaria (Islanda), care caută să izoleze enzime din microorganisme ce trăiesc în condițiile extreme din Islanda.

Un exemplu de aplicare a unui asemenea procedeu este sinteza unei hidroxisulfone care reprezintă intermediarul pentru fabricarea unui inhibitor al carbonic anhidrazei, utilizat pentru tratamentul glaucomului și care este comercializat de compania Merck (S.U.A.) sub denumirea de Trusopt. Doar diastereomerul (4*S*,6*S*) în care poziția substituentului metil din poziția 4 este *trans* față de substituentul din poziția 6 prezintă interes terapeutic (Zaks, 2001). Inițial s-a aplicat reducerea cetonei corespunzătoare pe cale chimică cu hidrură de litiu-aluminiu, însă se obținea izomerul nedorit *cis* (diastereomerul 4*S*,6*R*) în exces de 90%, fiind necesară o etapă de izomerizare cu acid sulfuric care nu reușea să elimine total acest izomer (raport *trans*/*cis* de 3:1 după izomerizare). Procedeul utilizat la ora actuală la nivel industrial a fost elaborat la compania Avencia (Marea Britanie) și constă în reducerea cetonei respective cu ajutorul unei oxidoreductaze fungice, produsă de microorganismul *Neurospora crassa*.



1,1-dioxo-2-H-2(S)-metil-4(S)-hidroxi-3,4-dihidro-tiofeno[2,3-b]tian

Reacția are loc în prezență de celule întregi ale acestui microorganism, la pH acid (sub 5) la care există avantajul că nu se produce epimerizarea produsului. În aceste

condiții, izomerul *trans* al hidroxisulfonei se obține cu randament ridicat (peste 80%) și exces diastereomeric de peste 98%.

6.2.6. Bioconversia cicloalcanonelor

Sinteza chimică a lactonelor din cetonele ciclice corespunzătoare pe cale chimică este binecunoscută. Lactona care se fabrică în cea mai mare cantitate pe plan mondial este caprolactona, din ciclohexanonă prin oxidare Baeyer-Williger cu acid peracetic. În sistemele biologice, ciclohexanona și ciclohexanolul sunt metabolizate printr-o secvență de reacții de oxidare (Thomas, DiCosimo și Nagarajan, 2002). Există o serie de microorganisme capabile să oxideze ciclohexanolul și ciclohexanona la acid adipic, de exemplu *Acinetobacter* sp., conform schemei de reacție prezentate în Figura 6.5. Enzimele implicate în acest proces sunt: A-ciclohexanol dehidrogenază; B-ciclohexanon monooxigenază; C-caprolacton esterază; D-6-hidroxi-hexanoat dehidrogenază; E-6-oxo-hexanoat oxidoreductază.

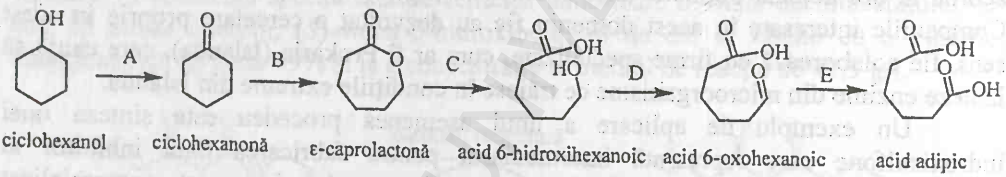


Figura 6.5. Ciclul de reacții care are loc în timpul oxidării ciclohexanolului la acid adipic în celulele de *Acinetobacter* sp.

Oxidarea ciclohexanonei la caprolactonă este catalizată de o monooxigenază de tip Baeyer-Williger. Reacții de oxidare catalizate de această enzimă pot fi utilizate pentru realizarea unei game largi de biotransformări, de exemplu pentru obținerea de lactone chirale, intermediari importanți în sinteza de prostaglandine. Și genele responsabile pentru biosinteza enzimelor care realizează celelalte reacții ale acestei căi metabolice au putut fi identificate și astfel a devenit posibilă de exemplu obținerea acidului 6-hidroxi-hexanoic, un compus bifuncțional cu aplicații în industria substanțelor de acoperire. Prin comparație, oxidarea chimică a ciclohexanolului la acid adipic se face industrial cu acid azotic și nu este posibilă izolarea intermediarilor parțial oxidați. Se poate realiza și oxidarea unor cetone ciclice mai mari pentru obținerea lactonelor corespunzătoare. Majoritatea aplicațiilor de acest tip au utilizat monooxigenaza Baeyer-Williger din *Acinetobacter* sp. NCIMB 9871, dar există o serie de cercetări recente care au utilizat și alte gene ce pot induce producerea de enzime de acest tip. Aplicarea industrială a acestor reacții de biotransformare este condiționată însă de punerea la punct a unor metode de regenerare sau reciclare ieftine ale cofactorilor.

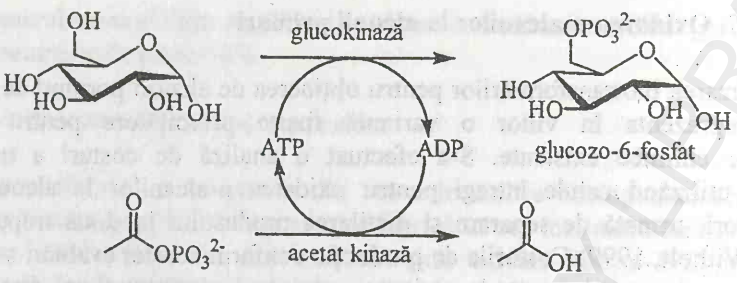
6.2.7. Oxidarea n-alcanilor la alcooli primari

Utilizarea biotransformărilor pentru obținerea de alcooli pornind de la n-alcani ar putea reprezenta în viitor o variantă foarte promițătore pentru înlocuirea tehnologiilor chimice existente. S-a efectuat o analiză de costuri a unui proces biocatalitic utilizând celule întregi pentru oxidarea n-alcanilor la alcoolii primari corespunzători, urmată de separare și distilarea produsului în două trepte (Mathys, Schmid și Witholt, 1999).Costurile de producție conform acestei evaluări s-ar ridica la 8$ SUA/kg produs, pentru ambele variante, procedeul continuu și cel discontinuu, în cazul unei producții de 10.000 de tone/an. Procesul necesită un volum de bioreactoare de 800 m^3 (procedeul continuu) respectiv 2000 m^3 (procedeul discontinuu), instalații pentru separarea fazelor, instalații de distilare a produsului și recuperare a materiei prime nereacționate, instalație de rectificare a produsului final. Repartizarea costurilor s-ar realiza după cum urmează: sursa de carbon (glucoză) și săruri pentru creșterea microorganismului 40%, amortizarea utilajelor 18-22%, substrat și solvenți 20%, energie 10%, tratarea apelor reziduale 5% și cheltuieli cu personalul 2%. Eficiența procesului se bazează pe activitatea volumetrică și stabilitatea catalizatorului. Regula de bază este că pentru produse a căror valoare este mai mică de 20$ SUA/kg este necesară o producție de peste 1.000 de tone pe an și o activitate a catalizatorului de peste 100 unități/litru pentru ca procesul să fie rentabil. În aceste condiții, dezvoltarea industrială a unui procedeu biocatalitic se poate face fără rezerve dacă prețul produsului obținut este mai mare de 20-30$ SUA/kg. Principalele cerințe de îmbunătățire ale acestor procese sunt legate de creșterea activității și stabilității biocatalizatorului. Astfel se pot reduce costurile cu mediul de cultură, cât și volumele echipamentelor de fermentație necesare pentru obținerea unei anumite producții. Obținerea unor produse cu prețul cuprins în domeniul 5-10$ SUA/kg poate fi rentabilă și chiar în cazul când prețul este între 2-5$ SUA/kg se poate discuta de rentabilitate, însă numai cu condiția realizării unei producții de peste 50.000 de tone pe an.

6.3. Reacții catalizate de transferaze

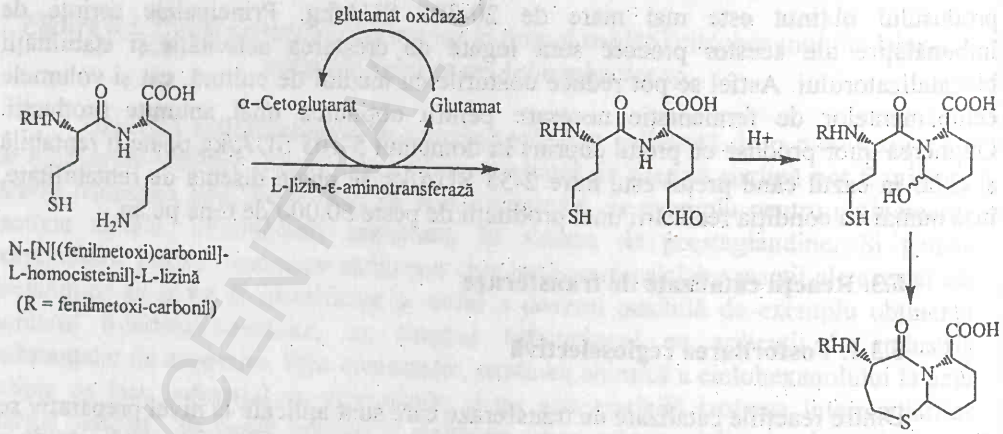
6.3.1. Fosforilarea regioselectivă

Dintre reacțiile catalizate de transferaze care sunt aplicate la nivel preparativ se poate aminti fosforilarea regioselectivă a glucozei la glucozo-6-fosfat, catalizată de o glucokinază (EC 2.7.1.2), în combinație cu o acetat kinază (EC 2.7.2.12) pentru regenerarea adenozin-difosfatului (Wandrey, Liese și Kihumbu, 2000). Această reacție este exploatată la nivel de zeci de kg la compania Unitika (Japonia).



6.3.2. Procese de transaminare

Compania farmaceutică Bristol-Myers Squibb (SUA) a elaborat o tehnologie pentru obținerea intermediarului chiral cheie în sinteza Omapatrilatului, un nou medicament pentru tratamentul hipertensiunii, aflat în faza de testare clinică (Zaks, 2001). În acest scop, a fost izolată o nouă L-lizin-ε-amonitransferază (EC 2.6.1.36), capabilă să oxideze gruparea ε-aminică a lizinei. Această enzimă, obținută prin tehnica îmbogățirii selective din microorganismul *Sphingomonas paucimobilis* SC 16113, a fost purificată și caracterizată, apoi clonată și exprimată în *Escherichia coli*. La ora actuală ea poate fi produsă la nivel industrial prin fermentație.

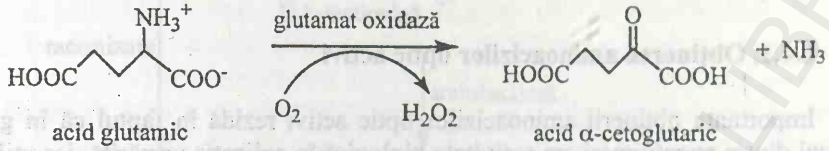


N-[N[(fenilmetoxi)carbonil]-L-homocisteinil]-L-lizină
(R = fenilmetoxi-carbonil)

Acid [4S-(4I,7I,10aJ)]1-octahidro-5-oxo-4-[fenilmetoxi)carbonil]amino]-7H-pirido-[2,1-b] [1,3]tiazepin-7-carboxilic

Fiind vorba de o reacție de transaminare, a fost necesar un acceptor pentru gruparea amino cedată de lizină, α-cetoglutaratul care se transformă în glutamat. Pentru regenerarea și recircularea glutamatului, care este un produs secundar în acest caz, s-a folosit o a doua reacție enzimatică cuplată cu prima, în care cetoglutaratul este oxidat la glutamat cu ajutorul unei glutamat oxidaze. Glutamat oxidaza (EC 1.4.3.11) a fost

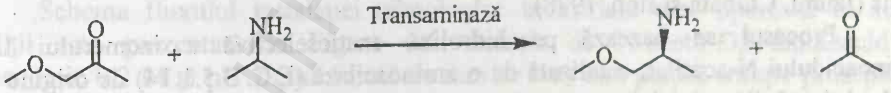
obținută prin fermentație din *Streptomyces noursei* SC 6007, clonată și exprimată în *Streptomyces lividans*.



acid glutamic — acid α-cetoglutaric

Substratul pentru intermediarul chiral dorit a fost o dipeptidă, N-(L-homocisteinil)-L-lizina, protejată la grupa amino a homocisteinei cu gruparea protectoare fenilmetoxi-carbonil. Reacția s-a efectuat la 30°C și pH 7,8 în soluție apoasă. Nu s-a utilizat enzima purificată ci o soluție enzimatică sub formă de extract obținut după dezagregarea celulelor. Reacția a fost finalizată prin adăugare de acid tricloracetic 10% pentru a se produce închiderea ciclului. Randamentul global al procesului a fost de 75-80% și aceeași enzimă s-a dovedit activă și pentru oxidarea altor dipeptide sau a L-lizinei protejate la gruparea ε-aminică.

Un proces eficient pentru sinteza (*S*)-metoxi-izopropilaminei, un intermediar important pentru obținerea unor ierbicide (metolacor și dimetenamidă) a fost dezvoltat la compania Celgro (S.U.A.). Reacția de bază este transaminarea enzimatică a metoxiacetonei cu izopropilamină (Zaks, 2001). Prin utilizarea tehnologiei de ADN recombinat au fost îmbunătățite atât proprietățile cinetice cât și termostabilitatea biocatalizatorului. În aceste condiții, procesul poate fi operat la temperatură ridicată, deplasând echilibrul nefavorabil în condiții normale în sensul formării produsului. În plus, acetona formată în proces este îndepărtată prin aplicare de vid, obținându-se o conversie de 97% și exces enantiomeric de peste 99%. Nu sunt publicate detalii suplimentare și date despre nivelul de producție la care se face această reacție.



(S)-metoxi-izopropilamină

6.4. Reacții catalizate de hidrolaze

Hidrolazele reprezintă clasa de enzime cu cel mai mare număr de aplicații industriale de biotransformare. Istoric, primul asemenea proces a fost cel de obținere a L-aminoacizilor prin hidroliză enantioselectivă catalizată de o aminoacilază fungică imobilizată, în 1969 în Japonia.

Din punct de vedere economic, procesele care utilizează hidrolaze pentru rezoluția cinetică a izomerilor optici prezintă dezavantajul că randamentul teoretic maxim este de 50%. Asemenea procese pot fi însă aduse la un randament apropiat de 100% dacă sunt combinate cu un proces de racemizare eficient al izomerului inactiv pentru aplicația dorită. Procedeul este numit rezoluție cinetică dinamică. Racemizarea

se poate realiza spontan (ca în cazul hidantoinazelor), prin modificarea condițiilor de reacție (temperatură, pH), sau prin utilizarea de catalizatori chimici (metale tranziționale) sau enzimatici.

6.4.1. Obținerea aminoacizilor optic activi

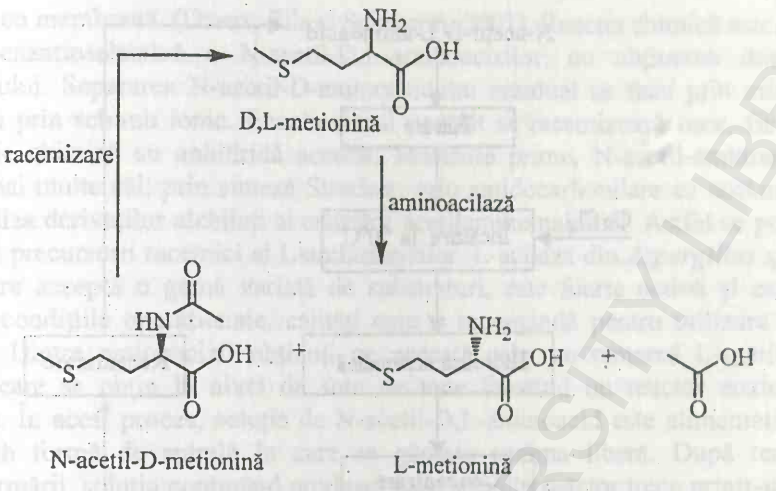
Importanța obținerii aminoacizilor optic activi rezidă în faptul că în general doar unul dintre enantiomeri are activitate biologică în aplicația urmărită, iar utilizarea lor s-a extins foarte mult în ultima perioadă atât în medicină cât și în industria alimentară și zootehnie. Drept urmare, sinteza aminoacizilor optic activi a fost foarte intens investigată. Varianta clasică de obținere a L-aminoacizilor o constituie hidroliza acidă a proteinelor, urmată de separarea aminoacizilor rezultați. Acestă metodă însă nu a putut asigura cererile tot mai mari care au apărut în ultimele decenii, motiv pentru care s-au dezvoltat procedeele fermentative și chimice de sinteză.

Procedeele fermentative nu reprezintă încă o alternativă economică viabilă decât în anumite cazuri (de exemplu al L-lizinei), iar cele chimice au dezavantajul că duc la obținerea unor amestecuri racemice. Pentru a separa enantiomerii L din aceste amestecuri există o serie de metode fizico-chimice, chimice, enzimatice sau biologice. Dintre acestea, metodele chimice (care se bazează pe interacțiunea cu un compus chimic optic activ ce reacționează numai cu unul din enantiomeri) și metodele enzimatice au ajuns în stadiul de aplicare industrială. Metodele enzimatice se bazează în majoritatea cazurilor pe separarea unuia sau ambilor enantiomeri din amestecuri racemice, însă în ultima perioadă s-au dezvoltat mult și metodele care utilizează percursori chirali sau prochirali.

Metoda enzimatică de separare a L-aminoacizilor din amestecuri racemice a fost industrializată în 1969 în Japonia la firma Tanabe Seiyaku Co., fiind prima tehnologie pe bază de enzime imobilizate care a fost folosită la scară industrială în lume (Izumi, Chibata și Itoh, 1978).

Procesul se bazează pe hidroliza enatioselectivă a izomerului L al aminoacidului N-acetilat, catalizată de o aminoacilază (E.C. 3.5.1.14) de origine fungică, obținută din culturi de *Aspergillus oryzae.*

Pentru creșterea eficienței procesului, s-a considerat că utilizarea enzimei în formă imobilizată este mai avantajoasă. În ce privește metoda de imobilizare a enzimei, au fost studiate adsorbția fizică, legarea ionică, legarea covalentă, înrețelarea și entraparea. Dintre toate acestea, trei variante au dus la obținerea unei enzime imobilizate cu activitate și stabilitate mare: legarea ionică pe DEAE-Sephadex (activitatea enzimei imobilizate a fost 59% din cea a enzimei native), legarea covalentă pe iodacetil-celuloză (39%) și entraparea în gel de poliacrilamidă (53%).



Comparându-se caracteristicile acestor trei enzime imobilizate, pentru varianta industrială s-a ales aminoacilaza imobilizată prin legare ionică pe DEAE-Sephadex, din următoarele considerente:

- activitatea preparatului imobilizat a fost cea mai mare, raportată la enzima solubilă;
- metoda de imobilizare este simplă;
- stabilitatea enzimei imobilizate este ridicată;
- regenerarea enzimei imobilizate dezactivate se poate face uşor.

Studiile efectuate cu acestă enzimă imobilizată au arătat că hidroliza derivaților N-acetilați ai D,L-aminoacizilor are loc în condiții optime la pH neutru (7-7,5), temperatura de 50°C şi în prezența ionilor de cobalt, aceştia având rol activator al enzimei.

Schema fluxului instalației tehnologice industriale care operează în aceste condiții este prezentată în Figura 6.6. Soluția de N-acetil-D,L-aminoacid de concentrație 0,2 M şi pH 7 (sub formă de sare de Na) este parțial soluție proaspătă şi parțial soluție recirculată de la etapa de racemizare a şarjei anterioare. Această soluție este trecută mai întîi printr-un filtru pentru reținerea impurităților, apoi printr-un schimbător de căldură unde se încălzeşte la temperatura de reacție (50°C). În continuare, soluția trece prin reactorul tip coloană în care se găseşte enzima imobilizată. Amestecul de reacție rezultat în urma hidrolizei enzimatice este concentrat într-un evaporator continuu şi apoi este răcit la o temperatură între 0-5°C, la care are loc separarea L-aminoacidului de N-acetil-D-aminoacid, pe baza solubilității sale mai reduse în apă la rece. L-aminoacidul cristalizat este separat într-un separator centrifugal, iar soluția de N-acetil-D-aminoacid este racemizată în cataliză bazică şi amestecul racemic rezultat este reintrodus în sistem.

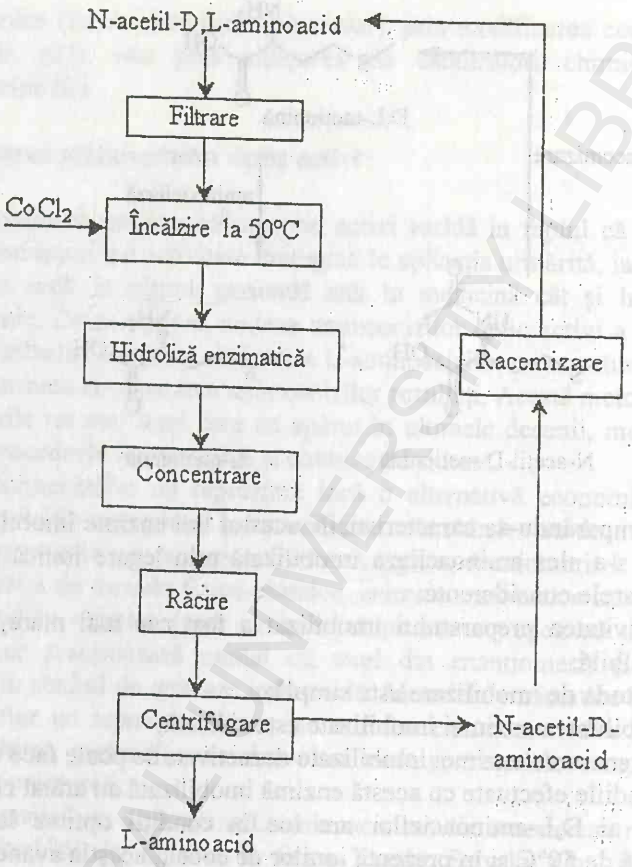


Figura 6.6. Fluxul tehnologic de fabricare şi separare a L-aminoacizilor din amestecul racemic, cu ajutorul aminoacilazei.

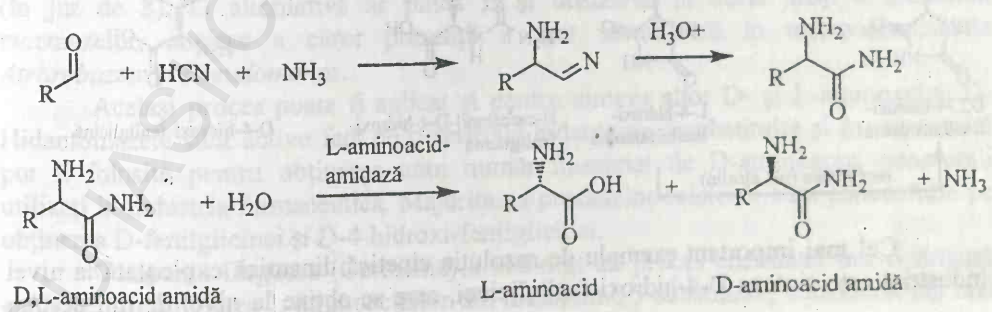
Acestă instalaţie continuă a permis obţinerea mai multor L-aminoacizi, dintre care cei mai importanţi sunt L-metionina, L-fenilalanina, L-triptofanul, L-valina, L-izoleucina. Capacitatea de producţie, calculată la o coloană enzimatică de 1000 l a fost cuprinsă între 500 şi 700 kg în 24 de ore. Stabilitatea operaţională a enzimei imobilizate a fost bună, ea păstrându-şi între 60-70% din activitatea iniţială după o exploatare continuă timp de 30 de zile, după care s-a făcut regenerarea coloanei enzimatice prin imobilizarea unei noi cantităţi de aminoacilază, corespunzătoare activităţii pierdute. Suportul, DEAE-Sephadex a fost utilizat timp de 5 ani fără a i se schimba capacitatea de legare a enzimei şi fără a suferi modificări sau deteriorări care să afecteze procesul. Acest procedeu se poate utiliza mai ales pentru obţinerea L-aminoacizilor a căror fabricare prin biosinteză este dificilă.

Compania Degussa fabrică din anii 1980 aminoacizi enantiomeric puri printr-o tehnologie asemănătoare, folosind însă L-acilază liberă provenită din *Aspergillus sp.* şi

un reactor cu membrană. (Drauz, Eils şi Schwarm, 2002). Reacția chimică este aceeaşi: hidroliza enantioselectivă a N-acetil-D,L-aminoacizilor, cu obținerea doar a L-aminoacidului. Separarea N-acetil-D-aminoacidului rezidual se face prin cristalizare directă sau prin schimb ionic. Enantiomerul nedorit se racemizează uşor, fie pe cale termică, fie chimică cu anhidridă acetică. Materiile prime, N-acetil-aminoacizii, se obțin pe mai multe căi: prin sinteză Strecker, prin amidocarbonilare cu acetamidă sau prin hidroliza derivaților alchilați ai esterilor acetilaminomalonici. Astfel se pot obține practic toți precursorii racemici ai L-aminoacizilor. L-acilaza din *Aspergillus sp.* este o enzimă care acceptă o gamă variată de substraturi, este foarte activă şi extrem de stabilă în condițiile operaționale, calități care o recomandă pentru utilizare la nivel industrial. Dintre aminoacizii obținuți pe această cale, se remarcă L-metionina şi L-valina, care se obțin la nivel de sute de tone folosind un reactor enzimatic cu membrană. În acest proces, soluția de N-acetil-D,L-aminoacid este alimentată într-un reactor sub formă de spirală în care se găseşte enzima liberă. După terminarea biotransformării, soluția conținând produsul care iese din reactor trece printr-un modul de ultrafiltrare prin porii căruia moleculele mici (apă, aminoacid, acetat) pot trece uşor, în timp ce moleculele mari de enzimă sunt reținute în interiorul reactorului. Această tehnologie permite obținerea L-aminoacizilor în regim continuu, cu un consum foarte redus de enzimă. Alți aminoacizi nenaturali se obțin în cantități mai mici, în reactoare cu agitare, folosind aceeaşi enzimă: L-norvalina, L-ciclopropilalanina, L-propargilglicina, L-p-fluorfenil-alanina, D-serina, L- şi D-3-(1'naftil)-alanina, L- şi D-3-(2'naftil)-alanina.

Compania DSM din Olanda are o îndelungată experiență în domeniul biocatalizei, începând din anii '70 când D,L-fenilglicinamida a fost separată în D-fenilglicinamidă şi L-fenilglicină, utilizând leucin aminopeptidază porcină şi L-α-aminoacilamidază din *Pseudomonas putida* (Boesten, 1976). La ora actuală DSM utilizează biocataliza, biotransformările şi tehnologiile fermentative alături de tehnologiile chimice clasice pentru a obține o gamă foarte variată de produse.

Printre produsele obținute prin biocataliză se numără L-aminoacizii nenaturali, care sunt intermediari foarte importanți în sinteza unor produşi farmaceutici. Spre deosebire de aminoacizii naturali, aceştia nu se pot obține prin fermentație. Varianta biocatalitică aplicată la DSM pentru obținerea L-aminoacizilor porneşte de la amidele racemice ale acizilor respectivi, care se obțin uşor din aldehide prin sinteză Strecker.



Rezoluția optică este realizată cu ajutorul enzimelor din categoria aminoacid-amid hidrolazelor, numite și amidaze (E.C. 3.5.1.4.). Aceste enzime pot fi utilizate la fabricarea atât a L- cât și a D-aminoacizilor (Schmid ș.a., 2001).

Enzima utilizată la DSM este strict L-selectivă, iar în urma reacției se obțin ambii izomeri optici ai aminoacidului (D-aminoacidul prin hidroliza chimică a D-amidei), cel nedorit fiind apoi reciclat după racemizare. Amidazele utilizate în aceste reacții provin din *Pseudomonas putida, Mycobacter neoaurum* sau *Ochrobactrum antropi*, având specificități de substrat, activități specifice și enantioselectivități diferite. Genele care poartă codul genetic al producerii amidazei au fost izolate și introduse în organisme de *Escherichia coli*, rezultând biocatalizatori cu proprietăți superioare. Pe această cale se fabrică o mare varietate de aminoacizi nenaturali, de exemplu cele care rezultă pe baza amidelor din Figura 6.7.

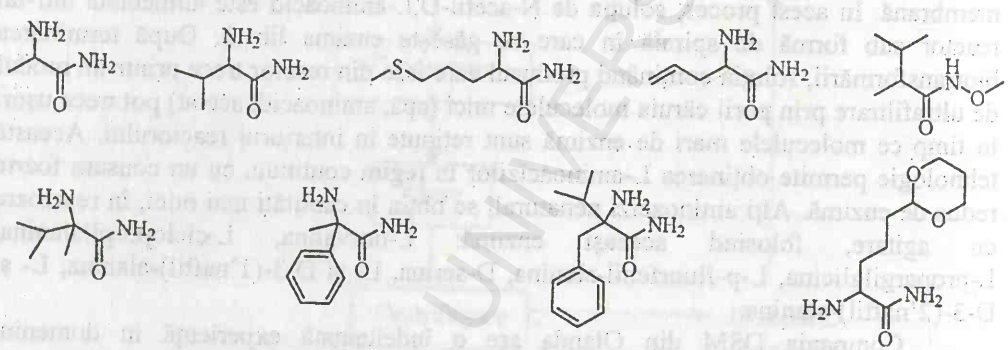
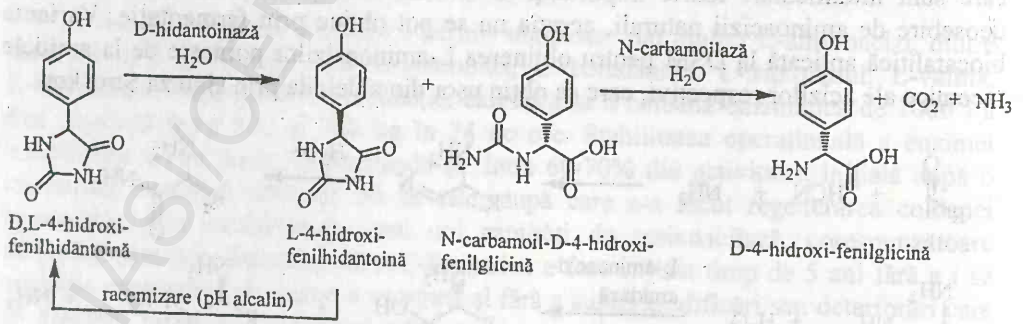


Figura 6.7. Exemple de substraturi pentru obținerea de aminoacizi nenaturali cu ajutorul amidazelor

O altă posibilitate de obținere a aminoacizilor optic activi o reprezintă hidroliza hidantoinelor 5-substituite la N-carbamoil-D-aminoacizii corespunzători cu ajutorul hidantoinazelor, numite și dihidropirimidinaze (E.C. 3.5.2.2).



D,L-4-hidroxi-fenilhidantoină — L-4-hidroxi-fenilhidantoină — N-carbamoil-D-4-hidroxi-fenilglicină — D-4-hidroxi-fenilglicină

Cel mai important exemplu de rezoluție cinetică dinamică exploatată la nivel industrial este sinteza D-4-hidroxi-fenilglicinei, care se obține la nivel de mii de t/an

din hidantoina corespunzătoare de o serie de producători, cei mai reprezentativi fiind Ajinomoto și Kanegafuchi (Japonia), Bayer și Degussa (Germania), DSM (Olanda) și Snam Progetti (Italia). D-4-hidroxi-fenilglicina este utilizată la sinteza penicilinelor și cefalosporinelor semisintetice.

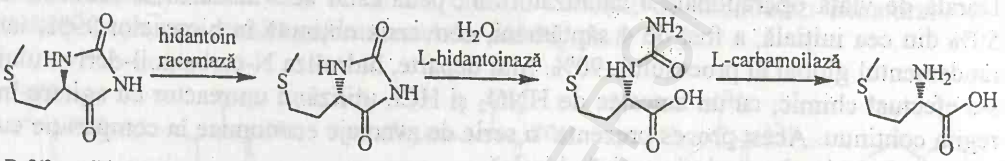
O variantă tehnologică utilizată cu bune rezultate cu câteva decenii în urmă a fost procedeul Kanegafuchi, industrializată în Singapore la o capacitate de 300 tone/an. În acestă variantă s-a lucrat cu celule imobilizate de *Bacillus brevis* care produc o hidantoinază. Metoda de imobilizare a fost entraparea în gel de alginat de calciu, iar tipul de bioreactor utilizat cel discontinuu cu agitare, din cauza solubilității scăzute a substratului. După imobilizare se regăsea 75% din activitatea enzimatică inițială. Durata de viață operațională a catalizatorului, până când activitatea sa se reducea la 50% din cea inițială, a fost de 4 săptămâni, conversia obținută în bioreactor 99%, iar randamentul global al procesului 90%. Mai departe, hidroliza N-carbamoil-derivatului s-a efectuat chimic, cu un amestec de HNO_2 și HCl, utilizând un reactor cu agitare în regim continuu. Acest proces prezenta o serie de avantaje economice în comparație cu procedeul clasic, de rezoluție optică chimică.

Și acest proces a fost perfecționat în ultimii ani, permitând efectuarea și a etapei de hidroliză a carbamoil derivatului tot pe cale biocatalitică (Schulze și Wubbolts, 2001). Reacția biocatalitică este realizată în prezența unor microorganisme de tip *Agrobacterium radiobacter* sau *Pseudomonas putida*, care au activitate atât de hidantoinază cât și de carbamoilază (N-carbamoil-D-aminoacid amidohidrolază). Mai recent, se utilizează în acest scop și tulpini de *Escherichia coli* recombinată, în care s-au grefat genele corespunzătoare din microorganismele producătoare de hidantoinază și carbamoilază. Modificarea microoganismului producător prin mutageneză spontană sau artificială a dus la obținerea unor specii cu caracteristici superioare, de exemplu N-carbamoil-D-aminoacid amidohidrolaza din *Agrobacterium* sp. KNK712. Cea de-a doua reacție enzimatică, cea catalizată de carbamoilază, este în esență o reacție de deprotecție a aminoacidului. În anumite cazuri însă, când reacția de hidroliză a hidantoinei nu are enantioselectivitate totală, cea de-a doua etapă are și rolul de creștere a purității optice a produsului, fiind de asemenea enatioselectivă. Izomerul nedorit, L-4-hidroxi-fenilhidantoina, se racemizează spontan în timpul procesului și astfel se obține o conversie ridicată. Tautomeria ceto-enolică ce determină racemizarea nu are loc întotdeauna la pH neutru și atunci este necesară realizarea unui pH alcalin (în jur de 8). O alternativă ar putea fi și utilizarea în acest scop a hidantoin racemazelor, enzime a căror prezență a fost identificată în microorganismele *Atrhrobacter* și *Pseudomonas*.

Același proces poate fi aplicat și pentru sinteza altor D- și L-aminoacizi. D-Hidantoinazele sunt active față de o serie de hidantoine 5-substituite și în consecință pot fi folosite pentru obținerea unui număr însemnat de D-aminoacizi nenaturali utilizați în industria farmaceutică. Majoritatea proceselor existente sunt concentrate pe obținerea D-fenilglicinei și D-4-hidroxi-fenilglicinei.

Compania Degussa (Germania) a elaborat un proces enzimatic într-o singură etapă pentru obținerea L-aminoacizilor din hidantoine 5-substituite, considerat cel mai

important eveniment al anului 2003 în domeniul sintezei organice fine. Hidantoinaza D-selectivă a fost transformată într-un mutant L-selectiv prin tehnica de evoluție direcționată, realizându-se și o creștere însemnată a activității. Se pare că acesta a fost primul caz în care s-a reușit schimbarea enantioselectivității unei enzime prin evoluție direcționată. În continuare această L-hidantoinază a fost combinată împreună cu o L-carbamoilază și o hidantoin racemază în celula de *Escherichia coli*, obținând un biocatalizator extrem de eficient pentru obținerea L-aminoacizilor naturali și nenaturali optic puri din hidantoine racemice. (Drauz, Eils și Schwarm, 2002). Astfel, este posibilă de exemplu conversia 5-(2-metiltioetil)-hidantoinei în L-metionină, fără a se obține și D-carbamoil-metionina nedorită.



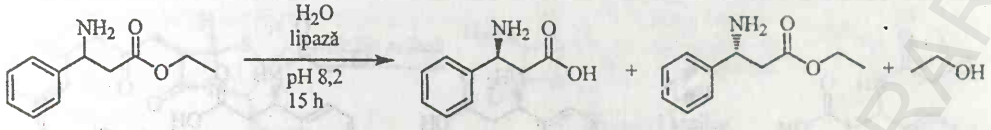
D-5(2-metiltioetil)-hidantoină — L-5(2-metiltioetil)-hidantoină — N-carbamoil-L-metionină — L-metionină

Instalația existentă la nivel pilot produce sute de kg de L-metionină, acid L-α-aminobutiric, L-norleucină, L-3-(3'-piridil)-alanină și alți aminoacizi.

Compania Dowpharma utilizează rezoluțiile biocatalitice catalizate de lipaze pentru obținerea β-aminoacizilor optic activi puri (Rouhi, 2004). Această tehnologie a fost dezvoltată inițial în cadrul firmei Chirotech din Anglia, care ulterior a devenit o membră a grupului Dow Chemical (S.U.A.). În variantele precedente de realizare a rezoluției amestecurilor racemice de β-aminoacizi era necesară protecția atât a grupării carboxil (prin esterificare) cât și a grupării amino. Soluția actuală nu mai necesită protecția grupării amino, are mai puține etape decât precedenta și duce la un produs de puritate enantiomerică de peste 99%. Această tehnologie este aplicată la ora actuală la nivel de tone. Înainte de a se adopta varianta biocatalitică a fost studiată și o variantă chimică pentru obținerea β -aminoacizilor optic activi, prin hidrogenarea catalitică asimetrică a unor duble legături din substraturi nesaturate. Aceasta s-a dovedit însă inferioară biocatalizei, având mai multe etape și faze și producând o cantitate mai mare de ape reziduale și deșeuri.

Dată fiind importanța deosebită a β -aminoacizilor și caracterul general al acestui tip de reacții catalizate de lipaze, există o serie de companii care oferă aceste produse obținute prin biocataliză. β-Aminoacizii optic activi sunt intermediari pentru o serie de medicamente, multe aflate în stadiu de testare și cererea față de aceste produse se întinde de la câteva sute de kg la câteva tone, în funcție de compusul sintetizat.

Procesul chemoenzimatic pentru sinteza β-L-fenilalaninei utilizat la Dowpharma pornește de la benzaldehidă, care se refluxează cu acid malonic și acetat de amoniu, obținându-se esterul etilic racemic al β-fenilalaninei. Acesta este supus rezoluției cinetice cu o lipază comercială, Amano PS (din *Pseudomonas fluorescens*).



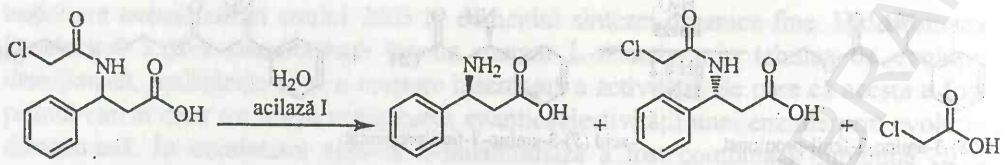
(*R,S*)-3-amino-3-fenil-propionat de etil

acid (*S*)-3-amino-3-fenilpropionic

Produsul dorit, acidul (*S*)-3-amino-3-fenil propionic (β-L-fenilalanina) se obține cu randament de separare de 44% și exces enantiomeric de 99%. Și celălat enantiomer se poate obține, cu exces enantiomeric de 98% și randament de separare de 38%, după saponificarea chimică cu NaOH a (*R*)-esterului rămas nehidrolizat.

Și compania germană Degussa sintetizează β-aminoacizi optic activi pe cale asemănătoare, pornind de la aminoacizii racemici respectivi, care sunt transformați în esteri și hidrolizați enantioselectiv în prezența unei lipaze comerciale (Rouhi, 2004). Se hidrolizează numai izomerul (*S*), iar aminoacidul respectiv precipită din mediul de reacție și se obține cu exces enantiomeric de peste 99,5%. Nivelul producției este de sute de kg de diverși β-aminoacizi, în viitorul apropiat această producție urmând să crească sensibil. Este interesant de menționat că, înainte de a adopta varianta biocatalitică, Degussa a încercat de asemenea procedeul chimic prin hidrogenarea eneamidelor α,β-nesaturate corespunzătoare. Folosind un catalizator propriu pe bază de rhodiu s-a obținut o puritate optică a produsului de numai 95%, insuficientă pentru un intermediar farmaceutic. Ei au încercat să valorifice și enantiomerul inactiv, fie prin reracemizare fie prin găsirea unei soluții de valorificare a acestuia. Rezultatul a fost descoperirea faptului că esterii (*R*)-β-aminoacizilor sunt agenți excelenți pentru rezoluția optică a altor compuși. Astfel s-a reușit utilizarea (*R*)-3-amino-3-fenil-propionatului de etil pentru rezoluția optică a *terț*-leucinei racemice în scopul obținerii D-*terț*-leucinei. Acest compus, care nu s-a putut obține până acum pe cale biocatalitică, este acum accesibil prin rezoluție chimică, însă folosind un produs secundar de la alt proces biocatalitic. *terț*-Leucina este un intermediar de bază pentru o serie de produse farmaceutice, catalizatori și liganzi, însă până acum doar cei pe bază de L-*terț*-leucină se puteau obține ușor, lipsind o tehnologie care să permită obținerea D-*terț*-leucinei la un preț competitiv.

La Degussa se utilizează două variante de tehnologii enzimatice pentru fabricarea β-aminoacizilor. Una este hidroliza esterilor racemici ai acestora cu ajutorul lipazei Amano PS, la pH peste 8 și temperatura camerei, fabricându-se astfel (*S*)-β-fenilalanina cu puritate chimică și optică foarte ridicată (conversie 41%, exces enantiomeric 99,6%). O a doua cale este hidroliza N-cloracetil-β-aminocizilor racemici cu ajutorul acilazei din rinichi de porc (Acylase I). S-a demonstrat că N-cloracetil derivații au reactivitate mult mai mare în această reacție decât N-acetil derivații, obținându-se, în soluție tampon fosfat, o conversie aproape cantitativă (49,6 %) și exces enantiomeric de peste 98% al produsului. (Grayson și Drauz, 2002).



acid (*R,S*)-N-cloracetil-3-amino-3-fenil-propionic

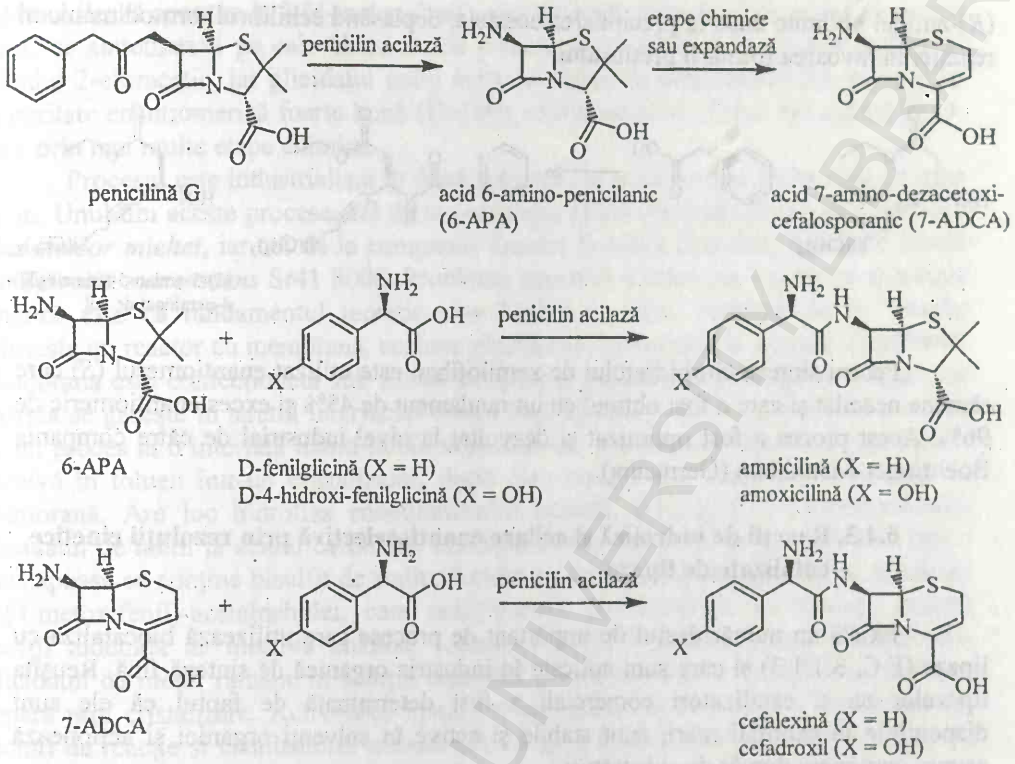
acid-(*S*)-3-amino-3-fenil-propionic

6.4.2. Obținerea unor antibiotice semisintetice cu penicilin acilază

Fabricarea penicilinelor semisintetice implică, drept etapă intermediară, hidroliza catenei laterale a unei peniciline naturale (G sau V) cu obținerea acidului 6-aminopenicilanic (6-APA), urmată de acilarea acesteia cu o clorură acidă. Metoda chimică de hidroliză este destul de complicată şi poate fi înlocuită cu succes de hidroliza enzimatică cu ajutorul enzimei penicilin amidază, numită şi penicilin acilază (E.C. 3.5.1.11). Au fost elaborate atât procese care utilizează enzima liberă cât şi procese cu enzima imobilizată (Parmar ş.a., 2000). La ora actuală există o serie de instalaţii industriale în Statele Unite, Japonia, Anglia, Suedia şi alte ţări care fabrică acid 6-aminopenicilanic utilizînd penicilin acilază imobilizată.

Metoda de imobilizare prin adsorbţie pe bentonită a fost aplicată industrial de compania Squibb din SUA. Penicilin acilaza se obţine din culturi microbiene de *Escherichia coli,* după dezagregarea celulelor, avînd un pH optim de acţiune între 7,5-8,5. S-a constatat că enzima este inactivată de produşii de reacţie, însă în cazul unui procedeu continuu cu un reactor tip coloană produşii se elimină din sistemul de reacţie şi nu se mai poate produce această inactivare. Un avantaj important al sistemelor cu enzime imobilizate comparativ cu enzimele solubile îl reprezintă faptul că produsul nu mai este impurificat cu urme de proteine care uneori pot cauza reacţii alergice ale organismului.

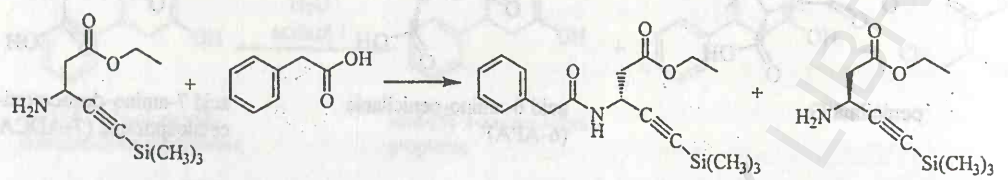
Companiile Smith Kline Beecham (Marea Britanie), Pfizer (S.U.A.) şi DSM fabrică acid 6-APA prin hidroliză enzimatică cu acilază la o scală de aproximativ 10000 tone/an. Compania DSM produce penicilină G şi V prin fermentaţie utilizând tulpini de *Penicillium chrysogenum* care au fost ameliorate atât prin metodele clasice cât şi prin inginerie genetică. O mare parte din penicilinele naturale este transformată în acid 6-aminopenicilanic (6-APA), care la rândul său este transformat în peniciline semisintetice (Schmid ş.a., 2001). Structura de bază a acidului 6-aminopenicilanic poate fi extinsă pe cale chimică sau enzimatică la structura de bază a cefalosporinelor semisintetice, ca de exemplu acidul 7-amino-dezacetoxi-cefalosporanic (7-ADCA). Prin cuplarea unor catene laterale la aceste structuri de bază ale acizilor menţionaţi se obţin peniciline respectiv cefalosporine semisintetice, care pe cale chimică se obţin destul de dificil, fiind necesare de exemplu temperaturi scăzute până la -80°C pentru a conserva inelul β-lactamic foarte sensibil.



Şi inelul β-lactamic al penicilinei G poate fi convertit chimic sau enzimatic (cu ajutorul enzimei expandază) la acid 7-fenilacetil-dezacetoxi-cefalosporanic, care este de asemenea un substrat pentru penicilin acilază şi poate fi hidrolizat enzimatic la acid 7-ADCA, intermediarul de bază pentru obţinerea cefalosporinelor semisintetice. D-fenilglicina şi D-4-hidroxi-fenilglicina reprezintă catenele laterale ce se ataşează la 6-APA respectiv 7-ADCA pentru obţinerea antibioticelor ampicilină şi amoxicilină, respectiv cefalexină şi cefadroxil. Ataşarea acestor catene laterale este realizată de preferinţă pe cale chimică, însă este posibilă şi sub acţiunea penicilin acilazei. Deşi penicilin acilaza este cunoscută mai ales pentru capacitatea sa de a hidroliza penicilinele G şi V, ea poate cataliza şi reacţii de condensare între derivaţi activaţi de acizi carboxilici şi diferite nuclee β-lactamice. Această reacţie poate fi utilizată pentru sinteza penicilinelor şi cefalosporinelor semisintetice, fiind exploatată la ora actuală pentru obţinerea unui antibiotic din clasa carbacefemelor, Loracarbef, de către compania Lilly din S.U.A. (Zaks, 2001).

Compania Monsanto (S.U.A.) a anunţat utilizarea penicilin acilazei pentru obţinerea intermediarului chiral cheie din tehnologia de sinteză a unui medicament împotriva trombocitelor, clorhidratul de xemilofiban. Astfel, 3-amino-5-(trimetilsilil)-4-pentinoatul de etil racemic este acilat enantioselectiv cu acid fenilacetic, în mediu acid, la pH 6 în prezenţa penicilin acilazei din *Escherichia coli*. Solubilitatea scăzută a

(*R*)-amidei obținute duce la precipitarea acesteia, deplasând echilibrul termodinamic al reacției în favoarea formării produsului.



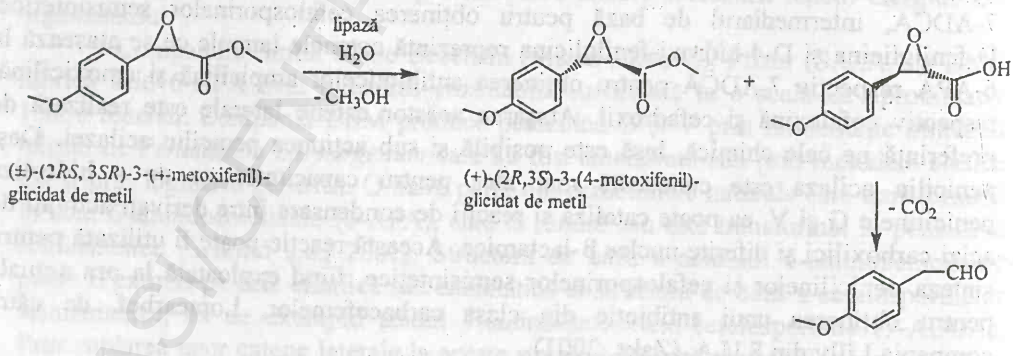
(*S*)-3-amino-5-(trimetilsilil)-4-pentinoat de etil

Pentru sinteza clorhidratului de xemilofiban este utilizat enantiomerul (*S*) care rămâne neacilat și care a fost obținut cu un randament de 45% și exces enantiomeric de 96%. Acest proces a fost optimizat și dezvoltat la nivel industrial de către compania Boehringer-Mannheim (Germania).

6.4.3. Reacții de hidroliză și acilare enantioselectivă prin rezoluții cinetice catalizate de lipaze

Există un număr destul de important de procese care utilizează biocataliza cu lipaze (E.C. 3.1.1.3) și care sunt aplicate în industria organică de sinteză fină. Reușita lipazelor ca și catalizatori comerciali a fost determinată de faptul că ele sunt disponibile în cantități mari, sunt stabile și active în solvenți organici și acționează asupra unui mare număr de substraturi.

Un exemplu de asemenea proces este sinteza chemoenzimatică a unui important medicament cu acțiune vasodilatatoare coronariană, numit diltiazem (Schulze și Wubbolts, 1999; Bornscheurer și Kazlauskas, 1999).



(±)-(2*RS*, 3*SR*)-3-(4-metoxifenil)-glicidat de metil

(+)-(2*R*,3*S*)-3-(4-metoxifenil)-glicidat de metil

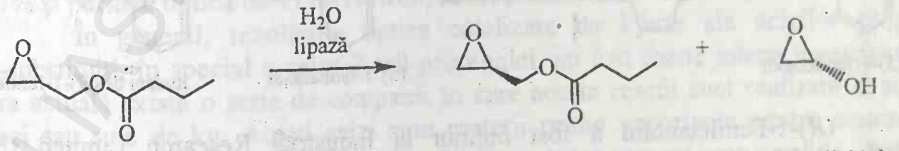
2-(4-metoxifenil)-acetaldehidă

Etapa enzimatică a acestei sinteze este rezoluția cinetică a racemicului (±)-(2*RS*,3*SR*)-3-(4-metoxifenil)-glicidat de metil, obținându-se (+)-(2*R*,3*S*)-3-(4-metoxifenil)-glicidatul de metil și acidul carboxilic corespunzător, care se

decarboxilează spontan la 2-(4-metoxifenil)-acetaldehidă. Glicidatul racemic (izomerul *trans*) se sintetizează pe cale chimică din p-metoxibenzaldehidă și esterul metilic al acidului 2-cloracetic, iar glicidatul optic activ se obține în urma hidrolizei enzimatice cu puritate enantiomerică foarte bună (E>100). Diltiazemul se obține din esterul optiv activ prin mai multe etape chimice.

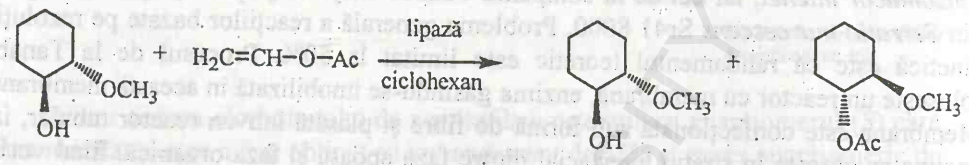
Procesul este industrializat în două variante, la nivel de mai multe sute de tone pe an. Unul din aceste procese, cel de la compania DSM (Olanda) folosește lipază din *Rhizomucor miehei*, iar cel de la compania Tanabe Seiyaku (Japonia) folosește lipază din *Serratia marcescens* Sr41 8000. Problema generală a reacțiilor bazate pe rezoluție cinetică este că randamentul teoretic este limitat la 50%. Procesul de la Tanabe folosește un reactor cu membrană, enzima găsindu-se imobilizată în această membrană. Membrana este confecționată sub formă de fibre și plasată într-un reactor tubular, iar enzima se găsește în stratul interfacial dintre faza apoasă și faza organică, fiind vorba de un proces la o interfață lichid-lichid suportată de membrană. Amestecul racemic se dizolvă în toluen într-un cristalizator, după care soluția este trimisă in reactorul cu membrană. Are loc hidroliza enantiomerului nedorit, (-)-(2*S*,3*R*)-3-(4-metoxifenil)-glicidatul de metil la acidul carboxilic corespunzător, care trece prin membrană într-o fază apoasă ce conține bisulfit de sodiu. Acidul se decarboxilează spontan cu formarea 2-(4-metoxifenil)-acetaldehidei, care reacționează cu bisulfitul. În absența acestei reacții aldehida ar inactiva enzima. Izomerul dorit, (+)-(2*R*,3*S*)-3-(4-metoxifenil)-glicidatul de metil, rămâne în soluția organică și este retrimis în cristalizator unde se separă prin cristalizare. Activitatea lipazei scade semnificativ după un număr de opt cicluri de reacție și catalizatorul trebuie activat prin imobilizarea unei noi cantități de enzimă în membrană. Deși enantioselectivitatea enzimei este totală în această reacție, are loc paralel și un proces de hidroliză chimică ce determină scăderea randamentului global. În aceste condiții, randamentul cu care se obține (+)-(2*R*,3*S*)-3-(4-metoxifenil)-glicidatul de metil cristalizat este de 43%, puritatea chimică și optică a produsului fiind de 100%. Prin aplicarea tehnologiei enzimatice, procesul de sinteză a diltiazemului a fost scurtat de la 9 etape la 5 etape (Shibatani, 1995).

Un alt proces catalizat de lipază care a fost dezvoltat la scală industrială este obținerea (*R*)-glicidil-butiratului din glicidil-butirat racemic la compania DSM. Reacția de hidroliză enzimatică are loc cu enantioselectivitate ridicată (E=13), iar produșii rezultați, (*R*)-glicidil-butiratul și (*S*)-glicidolul se pot converti ușor în (*R*)- și (*S*)-glicidil-tosilați, care sunt intermediari importanți în sinteza unor medicamente, cum ar fi β-blocanții optic activi. (*R*)-glicidil-butiratul este și unul din intermediarii de la fabricarea linezolidului, un antibiotic din clasa oxazolidinonelor.



(*R*,*S*)-glicidil butirat (*R*)-glicidil butirat (*S*)-glicidol

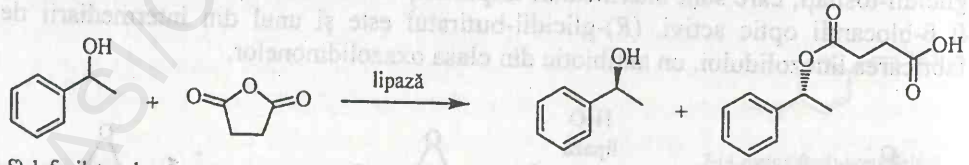
Un alt proces care se bazează pe o reacție de rezoluție cinetică catalizată de lipază este sinteza (+)-(1*S*,2*S*)-*trans*-2-metoxi-ciclohexanolului, intermediarul chiral cheie în sinteza antibioticelor β-lactamice triciclice. Procesul este aplicat la nivel de sute de kg/an în cadrul companiei GlaxoSmithKline (Marea Britanie) și se bazează pe transesterificarea enantioselectivă a *trans*-2-metoxi-ciclohexanolului (Schulze și Wubbolts, 1999). Avantajul acestei reacții este că se obține direct alcoolul dorit, enantiomerul mai puțin reactiv în reacția enzimatică.



trans-2-metoxi-ciclohexanol (+)-(1*S*,2*S*)-2-metoxi-ciclohexanol

Enzima utilizată este lipaza comercială imobilizată provenită din *Candida antarctica*. Aceasta își menține jumătate din activitatea inițială după nouă cicluri de folosire. Reacția se face în mediu de ciclohexan, concentrația inițială a substratului racemic fiind 1,4 M iar cea a acetatului de vinil 1,7 M. Se mai adaugă o mică cantitate de trietilamină pentru a neutraliza acidul acetic rezultat prin hidroliza acetatului de vinil. După 6-8 ore de reacție la temperatura camerei catalizatorul se separă prin filtrare iar produsul prin mai multe trepte de extracție. Randamentul final de obținere al (+)-(1*S*,2*S*)-*trans*-2-metoxi-ciclohexanolului este de 35%, iar excesul enantiomeric 99%.

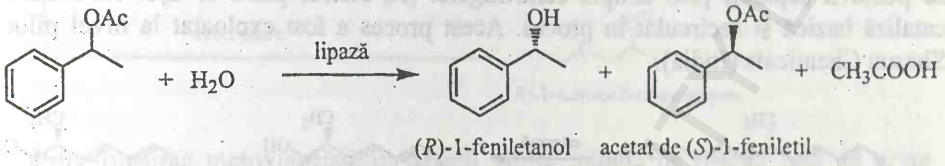
Compania BASF utilizează o serie de procese biotehnologice la scală industrială pentru fabricarea unor intermediari chirali și derivați ai acestora. Un astfel de proces este rezoluția enzimatică a unor alcooli racemici catalizată de lipază, obținându-se în acest mod o gamă largă de alcooli optic activi puri (Schmid ș.a., 2001). Aceste procese se bazează pe capacitatea diferiților nucleofili de a reacționa cu complexul acil-enzimă ce este caracteristic reacțiilor catalizate de lipaze. Compușii nucleofili cei mai utilizați sunt alcoolii, iar dacă alcoolul respectiv este racemic, se va acila în general doar unul dintre enantiomeri și biotransformarea va fi enantioselectivă. Drept donori de acil se utilizează compuși cu reactivitate mare ca esterii vinilici, anhidridele sau dicetena. Un exemplu aplicat la scală industrială este acilarea enantioselectivă a 1-feniletanolului racemic cu anhidridă maleică.



(*R*,*S*)-1-feniletanol (*S*)-1-feniletanol maleat de (*R*)-1-feniletil

(*R*)-1-Feniletanolul a fost obținut la Industrial Research Limited (Noua Zeelandă) la nivel pilot, utilizând lipază din *Pseudomonas cepacia* sub formă de cristale înrețelate (Altus Biologics, S.U.A.). Reacția utilizată a fost rezoluția cinetică a

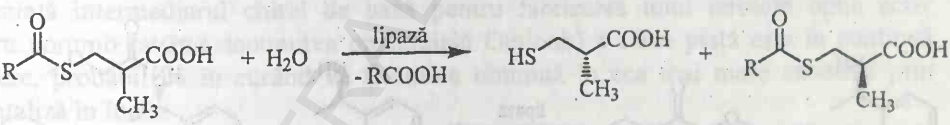
1-feniletil acetatului racemic, care s-a realizat într-un reactor cu agitare de 250 l, având un volum util de 100 l (Liese și Filho, 1999). Amestecul de reacție a fost bifazic, raportul fazelor apoasă/organică fiind de 0,3. Temperatura a fost de 30°C, iar pH-ul s-a menținut la 6,0 prin adăugare de NaOH. Cantitatea de catalizator a fost de 0,5 g/l masă de reacție, iar la terminarea reacției catalizatorul a fost separat prin filtrare și a fost reutilizat la șarja următoare.



(*R*)-1-feniletanol acetat de (*S*)-1-feniletil

După un timp de reacție de 18 ore s-a obținut un randament de 48%, iar excesul enantiomeric al produsului a fost de peste 99,9%. Produsul s-a separat prin distilare. Singura deficiență a acestui proces a fost pierderea unei părți din activitatea catalizatorului la recirculare, datorită pierderilor fizice înregistrate la operația de filtrare. În acest mod au fost prelucrate 270 kg de acetat de 1-feniletil racemic.

Nu numai esterii pot fi hidrolizați enantioselectiv de lipaze ci și tioesterii. O asemenea reacție a fost utilizată la compania Squibb (SUA) pentru obținerea acidului (*S*)-3-mercapto-2-metil-propanoic, intermediarul chiral cheie în sinteza captoprilului și altor medicamente importante cu acțiune hipertensivă. S-a demonstrat că la acești compuși izomerul (*S*) are o activitate de aproximativ 100 de ori mai mare decât (*R*). Hidroliza s-a făcut în prezența lipazei din *Pseudomonas fluorescens* (West, 1996).



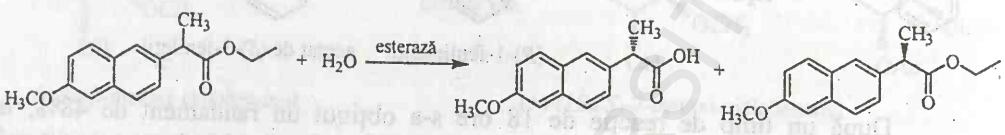
acid (2*R*)-3-mercapto-2-metil-propanoic

Ulterior compania Sqibb a brevetat o altă tehnologie, considerată a avea performanțe superioare hidrolizei și care se bazează pe esterificarea enantioselectivă a acidului 3-benzoiltio-2-metil-propanoic cu metanol în mediu de toluen și în prezența lipazei Amano P30 din *Pseudomonas fluorescens*. Și în acest caz reacția este (*R*)-selectivă, iar produsul dorit este substratul nereacționat care se obține cu randament de 37% și puritate optică de 97% (Howell, Patel și Szarka, 1995)

În general, rezoluțiile optice catalizate de lipaze ale acizilor propionici 2-substituiți, în special a celor 2-aril-propionici, au fost foarte intens investigate și la ora actuală există o serie de companii în care aceste reacții sunt realizate la scală de zeci sau sute de kg. Acești acizi sunt materii prime importante pentru sinteza unor ierbicide optic active și medicamente antiinflamatoare care nu sunt steroide (ibuprofen, naproxen, flurbiprofen). Puritatea optică necesară poate fi atinsă fie prin reacții de

esterificare sau transesterificare, fie prin hidroliza esterilor corespunzători (Rasor şi Voss, 2001)

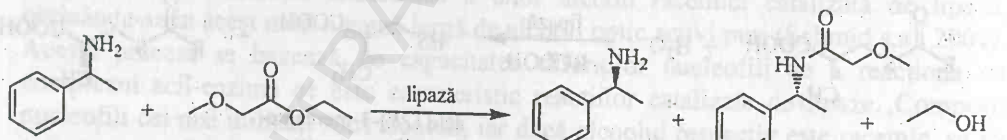
Compania Chirotech (Marea Britanie) a elaborat o tehnologie bazată pe o esterază ce hidrolizează doar (*S*)-esterul naproxenului. Concentraţia iniţială a substratului în mediul de reacţie este de 150 g/l. Esterul etilic are solubilitate redusă în mediu apos, ceea ce permite ca la sfârşitul reacţiei (*S*)-acidul şi (*R*)-esterul nehidrolizat să poată fi separaţi prin simplă centrifugare. (*R*)-esterul poate fi uşor racemizat în cataliză bazică şi recirculat în proces. Acest proces a fost exploatat la nivel pilot la Shasun Chemicals (India).



esterul etilic al (R,S)-naproxenului (S)-naproxen

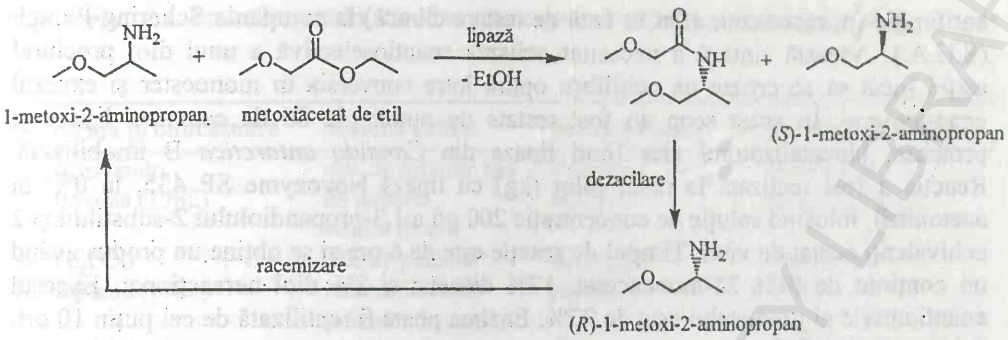
În cadrul Chemie Linz Co. (Austria) acidul (*S*)-2-clorpropanoic este fabricat la un nivel de 100 kg/şarjă prin esterificarea enantioselectivă a izomerului (*S*) cu butanol, catalizată de lipaza pancreatică de porc, în mediu de hexan anhidru. Timpul de reacţie este de câteva ore, randamentul fiind de 75% din cel teoretic, iar excesul enantiomeric al produsului este mai mare de 99%.

Enantioselectivitatea lipazelor este exploatată în cadrul companiei BASF pentru a obţine o gamă largă de (*R*)- şi (*S*)-amine, la o scală de 100 tone/an, prin acilare enantioselectivă, utilizând lipaza din *Burkholderia plantarii* drept catalizator.



(*R,S*)-1-fenil-etilamină metoxiacetat de etil (*S*)-1-fenil-etilamină (*R*)-2-metoxi-(1-feniletil)-acetamidă

Agentul de acilare cel mai eficient este metoxiacetatul de etil (Schmid ş.a., 2001). Elementul cheie al acestui proces l-a reprezentat descoperirea faptului că esterii metoxiacetici reacţionează mult mai repede decât esterii acetici. Esterii activaţi nu sunt potriviţi pentru această reacţie deoarece ar avea loc în paralel şi o reacţie de acilare necatalizată şi puritatea optică a produsului ar fi afectată.



Prin folosirea metoxiacetatului de etil viteza inițială de reacție este de peste 100 de ori mai mare decât în cazul folosirii acetatului de butil. Activarea se explică prin creșterea caracterului electrofil al grupării carbonilice. Acest proces, industrializat din anul 1993, este caracterizat de randament și selectivitate excelentă, cu utilizarea doar a unei cantități minime de enzimă. Produșii, (*R*)-amida și (*S*)-amina, se separă prin distilare și au puritate optică și chimică foarte ridicată. Enantiomerul nedorit este racemizat și reciclat în proces, pentru a se realiza o conversie totală a materiei prime.

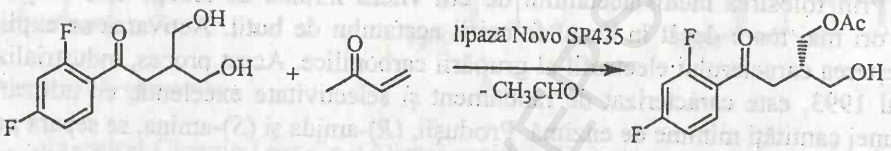
Procesul poate fi aplicat pentru o gamă largă de amine, care prezintă mare interes ca intermediari chirali sau auxiliari pentru obținerea unor compuși bioactivi. La ora actuală pe această cale se obțin mai multe amine aromatice chirale, în cantități de până la câteva sute de tone, utilizând o singură instalație multifuncțională. (*S*)-1-metoxi-2-aminopropanul se fabrică din anul 2001 la BASF, în cantitate de 2000 t pe an, prin acilarea enantioselectivă a 1-metoxi-2-aminopropanului racemic. Întrucât reprezintă intermediarul chiral de bază pentru fabricarea unui ierbicid optic activ pentru porumb (având denumirea comercială Outlook) a cărui piață este în continuă creștere, probabil că în curând va fi amina obținută în cea mai mare cantitate prin biocataliză în lume.

Alături de utilizarea pentru obținerea de alcooli și amine optic active, lipazele au și alte aplicații. De exemplu esterii enolici pot fi protonați stereoselectiv sau pot fi realizate reacții ca scindarea esterilor oximelor, formarea de legături carbon-carbon sau reacții Michael (adiția nucleofilă a unui carbanion la o grupare carbonilică α -β nesaturată). Pentru a aduce însă și aceste procese la nivel industrial, este nevoie de îmbunătățirea lor substanțială.

6.4.4. Reacții de asimetrizare catalizate de lipaze

Există reacții catalizate de enzime care au la bază un substrat prochiral simetric, iar biotransformarea se produce doar la nivelul unei singure grupări funcționale obținându-se un produs optic activ. Asemenea reacții, numite de asimetrizare, au fost realizate mai ales cu ajutorul hidrolazelor. Dintre aplicațiile industriale ale acestor reacții, este interesantă obținerea unui 1,3-propandiol 2-substituit, intermediarul chiral cheie pentru fabricarea unui nou medicament

antifungic (posaconazol, aflat în fază de testare clinică) la compania Schering-Plough (S.U.A.). Această sinteză a necesitat acilarea enantioselectivă a unui diol prochiral astfel încât să se creeze un echilibru optim între conversia în monoester şi excesul enantiomeric. În acest scop au fost testate un număr de 86 de esteraze, lipaze şi proteaze, biocatalizatorul ales fiind lipaza din *Candida antarctica* B imobilizată. Reacţia a fost realizată la nivel pilot (kg) cu lipază Novozyme SP 435, la 0°C în acetonitril, folosind soluţie de concentraţie 200 g/l a 1,3-propandiolului 2-substituit şi 2 echivalenţi acetat de vinil. Timpul de reacţie este de 6 ore şi se obţine un produs având un conţinut de 81% 2*S*-monoacetat, 17% diacetat şi 2% diol nereacţionat. Excesul enantiomeric al produsului este de 97%. Enzima poate fi reutilizată de cel puţin 10 ori. (Morgan, ş.a., 1997).



(2*S*)-2-[2'-(2",4"-difluorofenil)-2'-propenil]-1-acetoxi-3-hidroxypropan

6.4.5. Obţinerea unor gliceride modificate cu lipaze

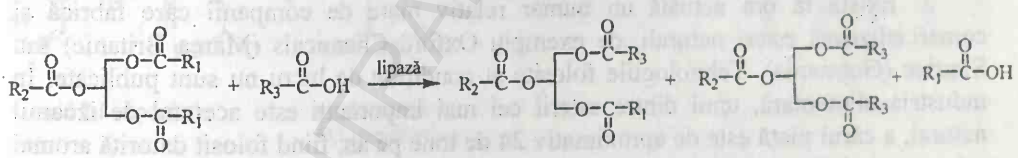
Reacţiile de interesterificare şi transesterificare ale grăsimilor catalizate de enzime reprezintă de asemenea un subiect de mare actualitate în biocataliza industrială. Când s-au început cercetările în direcţia unei posibile utilizări a lipazelor în domeniul trigliceridelor modificate, principalele preocupări au constat în obţinerea unor produse a căror structură în trigliceride şi proprietăţi fizice să fie asemănătoare cu cele ale untului de cacao. Untul de cacao este probabil cel mai scump dintre grăsimile şi uleiurile comercializate pe scară largă. Tehnologia care a fost brevetată în 1980 de compania Unilever (Marea Britanie) pentru obţinerea unui înlocuitor al untului de cacao pe bază de ulei de palmier a reprezentat prima tehnologie industrială care utiliza o enzimă în mediu organic (Coleman şi Macrae, 1980). O serie de alte variante de sinteză au fost brevetate de diferite companii, mai ales japoneze, o sinteză a acestora fiind prezentată în Tabelul 6.4. (Lazar, 1985).

Începând din anul 1988, firma Fuji Oil a reuşit industrializarea propriului procedeu utilizând o lipază imobilizată, însă nu există date referitoare la producţia realizată (Tosa şi Shibatani, 1995). La compania Unilever, instalaţia de producţie industrială a intrat în exploatare în anul 1993 la Loders Croklaan (o filială a lui Unilever din Olanda), intervalul de timp scurs între demararea cercetărilor şi aplicarea lor industrială fiind de 20 de ani (West, 1996). Procesul enzimatic de transesterificare este mai avantajos decât cel chimic catalizat de metoxid de sodiu, deoarece distribuţia grupărilor acil în trigliceridă nu mai este aleatoare în cazul în care se foloseşte o lipază 1,3-regioselectivă.

Tabelul 6.4. Procedee enzimatice brevetate pentru obținerea de înlocuitori de unt de cacao.

Firma producătoare	Materii prime	Sursa enzimei	Condiții de reacție
Ajinomoto Japonia (1982)	ulei de măsline sau de palmier stearat de etil	*Rhizopus delemar*	discontinuu benzină, 40°C
Fuji Oil Japonia (1983)	ulei de palmier stearat de metil palmitat de metil	*Rhizopus japonicus*	discontinuu 45°C
Asahi Denka Japonia (1983)	ulei de palmier acid stearic	*Rhizopus delemar*	discontinuu n-hexan, 40°C
Unilever Olanda (1980)	ulei de palmier acid stearic	*Rhizopus delemar*	discontinuu eter de petrol, 40°C
Unilever Olanda (1983)	ulei de palmier acid miristic	*Aspergillus niger*	reactor continuu tip coloană, 40°C

Untul de cacao este constituit în majoritate din trigliceride având în poziția 2 rest de acid oleic, iar în pozițiile 1 și 3 resturi de acid palmitic și stearic (16% POP, 41% POSt și 27% (StOSt). Pentru a fabrica înlocuitori mai ieftini de unt de cacao, se folosește transesterificarea (acidoliza) fracțiunii medii de ulei de palmier, care are un conținut ridicat de POP, cu acid stearic. Pentru ca să se obțină un produs cu proprietăți asemănătoare celui natural, trebuie folosită o lipază 1,3-regioselectivă, pentru ca grupările stearil să intre numai în pozițiile 1 și 3 ale moleculei, nu și în poziția 2 (Macrae, 1985).



$R_1 = CH_3-(CH_3)_{14}-$

$R_2 = CH_3-(H_2C)_7-HC=CH-(CH_2)_7-$

$R_3 = CH_3-(CH_3)_{16}-$

Procedeul industrial utilizează sistemul de reacție continuu cu strat fix de catalizator pentru reacția dintre fracțiunea medie de ulei de palmier și acid stearic în hexan, iar drept catalizator lipază din *Mucor miehei* produsă de Novo (Macrae, 1989). Proporția relativă a grupărilor acil în produs se reglează prin raportul reactanților, varianta cea mai bună fiind o parte (în greutate) ulei de palmier la 0,5 părți acid stearic. Drept solvent organic s-au utilizat alcani (hexan) sau o fracțiune de eter de petrol. Reacția are loc la 40°C, în regim continuu, timpul de înjumătățire al activității catalizatorului fiind de aproximativ 60 de zile. Unul dintre parametrii determinanți a fost conținutul de apă din sistem, pentru că un conținut prea mare duce la reacții

secundare de hidroliză, în timp ce unul prea scăzut determină inactivarea catalizatorului. S-a stabilit că la intrarea în reactor conținutul optim de apă al amestecului de reacție trebuie să fie de 0,06%. În reacție se formează și mici cantități de digliceride și acizi grași ca produse secundare în urma reacției de hidroliză a trigliceridelor prezente. Aceasta reacție secundară are loc mai ales în prima oră de reacție, după care se ajunge la o compoziție de echilibru a produsului de reacție ce nu se mai modifică în continuare. După îndepărtarea solventului și acidului gras, produsul s-a fracționat prin tehnicile convenționale, rezultând un amestec de trigliceride foarte asemănător ca și compoziție și proprietăți fizice (în special intervalul de topire) cu untul de caco.

6.4.6. Utilizarea lipazelor pentru fabricarea esterilor aromatizanți

Un mare număr de esteri sunt utilizați în pafumerie și industria alimentară cu rol de aromatizanți. Sinteza lor se poate face simplu și ieftin pe cale chimică, însă în ultima perioadă a apărut cerința de a se folosi produse naturale, mai ales pentru aplicațiile din industria alimentară: sucuri, înghețate, produse de cofetărie, ciocolată, etc. Dacă materiile prime sunt naturale, esterii fabricați prin biocataliză pot fi considerați de asemenea naturali (Directiva 88/388/CEE) (Welsh, Murray și Williams, 1989). Lipazele sunt catalizatori excelenți pentru reacțiile de esterificare, una dintre speciile cele mai avantajoase din punct de vedere al costului fiind lipaza din *Candida cylindracea*, al cărui preț pe kilogram în variantă industrială este cuprins între 80 și 440$ SUA (West, 1996). Trebuie menționat însă că pentru fiecare tip de ester sintetizat trebuie găsită lipaza corespunzătoare, deoarece s-a demonstrat că aceeași lipază nu catalizează la fel de bine esterificarea unor substraturi diferite.

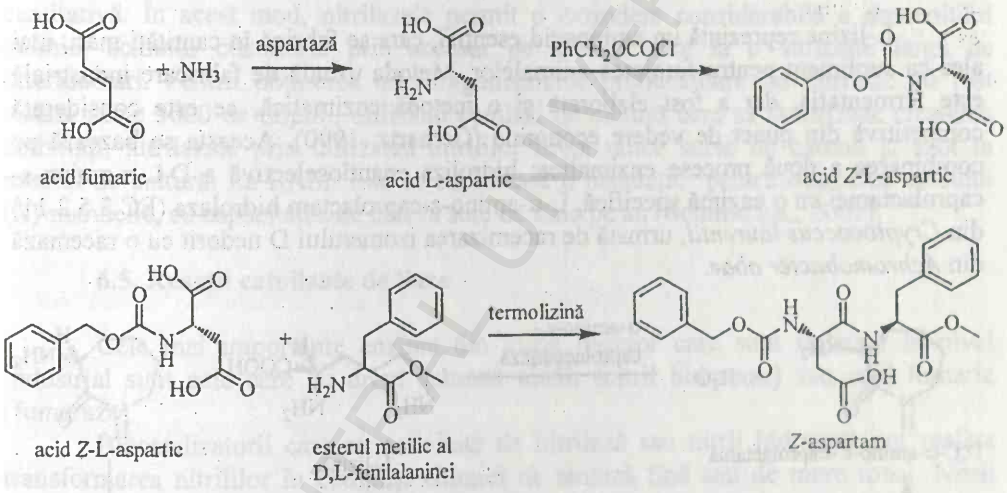
Există la ora actuală un număr relativ mare de companii care fabrică și comercializează esteri naturali, de exemplu Oxford Chemicals (Marea Britanie) sau Simrise (Germania). Tehnologiile folosite și condițiile de lucru nu sunt publicate. În industria alimentară, unul dintre esterii cei mai importanți este acetatul de izoamil natural, a cărui piață este de aproximativ 24 de tone pe an, fiind folosit datorită aromei sale caracteristice de banană.

6.4.7. Utilizarea biocatalitică a proteazelor

Aspartamul este o dipeptidă cu conținut caloric redus care se obține din acid L-aspartic și esterul metilic al fenilalaninei și se utilizează ca îndulcitor. Pentru a obține produsul corespunzător, este importantă poziția grupării carboxilice a acidului aspartic la care se realizează cuplarea, întrucât numai α-aspartamul are gust dulce (de 150-200 ori mai dulce ca zaharoza), β-aspartamul fiind amar. Realizarea acestei specificități este destul de dificilă pe cale chimică, de aceea procedeul enzimatic s-a impus în practica industrială. Enzima utilizată este termolizina (E.C. 3.4.24.4) o metaloprotează neutră produsă de *Bacillus thermoproteolyticus*, care are o selectivitate absolută pentru gruparea α-carboxilică a acidului aspartic (Meijer ș.a., 1985). Deoarece din motive

economice enzima trebuie refolosită de cât mai multe ori, ea este fie imobilizată fie utilizată într-un reactor cu membrană. Mediul de reacție poate fi bifazic, când produsul format în faza apoasă trece imediat în faza organică, sau un solvent organic. Cea de-a doua variantă este mai avantajoasă atunci când se lucrează cu enzimă imobilizată. Există mai multe variante tehnologice pentru acest proces, dintre care au fost industrializate două, la Toyo Soda (Japonia) și DSM (Olanda).

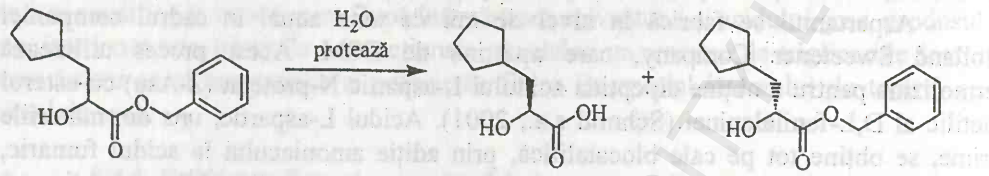
Aspartamul se fabrică la nivel de mii de tone anual în cadrul companiei Holland Sweetener Company, care aparține de DSM. Acest proces utilizează termolizina pentru a obține dipeptida acidului L-aspartic N-protejat (Z-Asp) cu esterul metilic al D,L-fenilalaninei (Schmid ș.a., 2001). Acidul L-aspartic, una din materiile prime, se obține tot pe cale biocatalitică, prin adiția amoniacului la acidul fumaric, catalizată de enzima amoniu-liază (aspartază). Protejarea grupării aminice se realizează prin introducerea grupării protectoare benziloxicarbonil (*Z*) în modul cunoscut, prin reacția cu clorură de benziloxicarbonil.



Reacția de cuplare a celor doi aminoacizi sub acțiunea termolizinei are o selectivitate remarcabilă. Dintre cele patru conformații posibile, ținând cont și de grupările α- și β-carboxil ale acidului *Z*-aspartic, termolizina catalizează cuplarea doar a esterului metilic al L-fenilalaninei cu α-carboxilul acidului *Z*-aspartic, obținându-se *Z*-aspartamul. Gruparea protectoare este apoi îndepărtată prin hidrogenare catalitică, iar esterul metilic al D-fenilalaninei poate fi racemizat și reciclat în proces.

Chiar dacă în rezoluțiile cinetice există dezavantajul că nu se poate depăși conversia de 50%, simplitatea procesului face ca acestea să fie avantajoasă pentru obținerea de intermediari farmaceutici, chiar în cazurile în care nu se face racemizarea enantiomerului nefolositor pentru procesul respectiv. Un asemenea procedeu a fost dezvoltat la compania Hoffmann-La Roche (Elveția) pentru rezoluția optică enzimatică

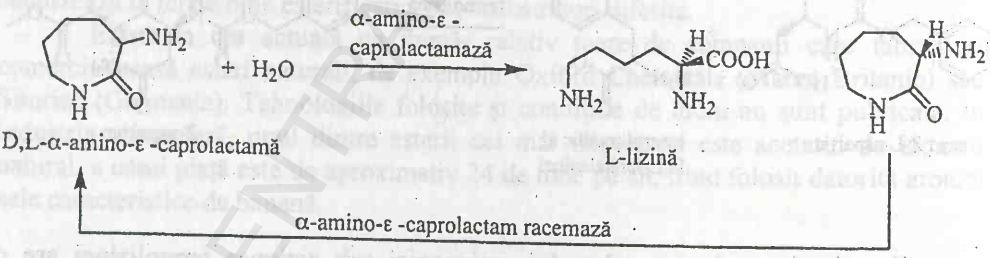
a 4-ciclopentil-lactatului de benzil, pentru a obține intermediarul chiral de bază în sinteza unui medicament cu rol de inhibitor al colagenazei. Reacția de hidroliză a fost catalizată de o protează comercială, L660 din *Bacillus licheniformis*, iar produsul util care este enantiomerul (*R*) nehidrolizat s-a obținut cu randament de 44% și exces enantiomeric de 98% (Zaks, 2001). Această tehnologie se aplică la nivel de 100 kg.



(R)-4-ciclopentil-lactat de benzil

6.4.8. Obținerea L-lizinei din D,L-α-amino-ε-caprolactamă

L-lizina reprezintă un aminoacid esențial, care se fabrică în cantități mari, mai ales ca supliment pentru furajarea animalelor. Metoda uzuală de fabricare industrială este fermentația, dar a fost elaborată și o metodă enzimatică, ce este considerată competitivă din punct de vedere economic (Gerhartz, 1990). Aceasta se bazează pe combinarea a două procese enzimatice: hidroliza enantioselectivă a D,L-α-amino-ε-caprolactamei cu o enzimă specifică, L-α-amino-ε-caprolactam hidrolaza (EC 3.5.2.11) din *Cryptococcus laurentii*, urmată de racemizarea izomerului D nedorit cu o racemază din *Achromobacter obae*.

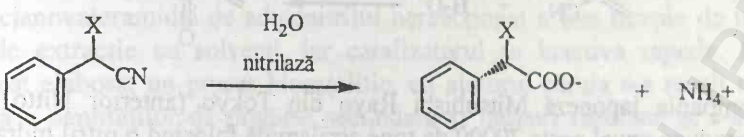


Se utilizează o soluție cu concentrația de 10% D,L-α-amino-ε-caprolactamă, iar procesul este realizat într-un reactor discontinuu, cu celule întregi de *Cryptococcus laurentii* și *Achromobacter obae*. După un timp de reacție de 25 de ore, se obține o conversie practic cantitativă. Această tehnologie este utilizată în Japonia la compania Toray Industries pentru a fabrica 4000 tone/an clorhidrat de L-lizină.

6.4.9. Hidroliza nitrililor

Acizii amino- și hidroxi-carboxilici reprezintă o clasă interesantă de intermediari. Acești compuși pot fi obținuți stereoselectiv și cu randamente mari cu

ajutorul nitrilazelor (nitril aminohidrolaze, EC 3.5.5.1), enzime ce catalizează hidroliza nitrililor la sărurile de amoniu ale acizilor carboxilici corespunzători.



X = NH_2, OH

Această clasă de enzime este utilizată industrial în cadrul companiei BASF, întrucât permite valorificarea unor capacități existente în chimia acidului cianhidric, ce furnizează materiile prime. În cazul α -hidroxi-nitrililor, ambii enantiomeri pot fi valorificați deoarece se cunoaște faptul că cianhidrinele racemizează în soluții apoase. Prin alegerea corespunzătoare a pH-ului se poate obține o conversie enzimatică cantitativă. În acest mod, nitrilazele permit o extindere considerabilă a domeniului chimiei acidului cianhidric prin accesul pe această cale la o varietate largă de intermediari. Pentru obținerea microorganismelor producătoare de nitrilază au fost testate peste 5000 de tulpini, utilizând condiții de cultură care să favorizeze creșterea activității nitrilazice prin utilizarea nitrililor drept unice surse de carbon și azot în mediul de cultură. La BASF este în exploatare o instalație pentru obținerea acidului (*R*)-mandelic, cu capacitatea de câteva sute de tone pe an (Schmid ș.a., 2001).

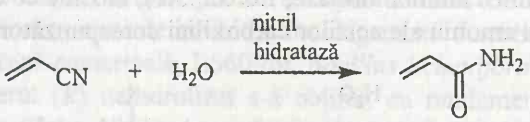
6.5. Reacții catalizate de liaze

Cele mai importante enzime din clasa liazelor care sunt utilizate la nivel industrial sunt cele care au drept substrat nitrili (nitril hidrataze) sau acid fumaric (fumaraza).

Biocatalizatorii care au activitate de nitrilază sau nitril hidratază pot realiza transformarea nitrililor în compuși chimici de sinteză fină sau de mare tonaj. Nitril hidrataza catalizează conversia nitrililor în amidele corespunzătoare, în timp ce nitrilaza transformă nitrilii în acizii carboxilici respectivi și amoniac. Aceste enzime oferă posibilități unice pentru transformările nitrililor, deoarece ele pot fi chemoselective, regioselective sau enantioselective și nu necesită condiții de reacție aspre sau temperaturi ridicate. Pentru a crește competitivitatea procedeelor enzimatice cu nitrilaze este nevoie de optimizarea activității specifice a catalizatorului, condițiilor de imobilizare și productivității reactorului enzimatic.

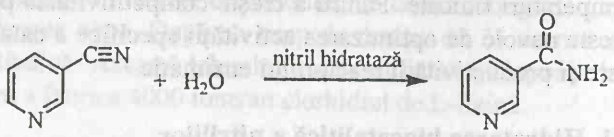
6.5.1. Hidratarea biocatalitică a nitrililor

Transformarea acrilonitrilului în acrilamidă este exemplul cel mai elocvent de utilizare a unei enzime într-o sinteză clasică din industria organică în care nu se obține un produs chiral ci unul de tonaj mare.



Compania japoneză Mitsubishi Rayo din Tokyo (anterior Nitto Chemical Industry) produce anual peste 20000 de tone acrilamidă folosind o nitril hidratază (EC 4.2.1.84) provenită din *Rhodococcus rhodochrous* J1, care fusese izolată în 1996 şi a fost ameliorată pentru a putea realiza producţia industrială. Fabricarea acrilamidei se face în procedeu continuu din acetonitril, la temperatura de 10°C, într-o serie de reactoare cu pat fix de catalizator, folosind celule din acest microorganism imobilizate în poliacrilamidă (Thomas, DiCosimo şi Nagarajan, 2002). Conversia acrilonitrilului la acrilamidă este practic completă, concentraţia produsului final este de 50% în apă, iar productivitatea catalizatorului este de peste 7 kg acrilamidă la 1 g celule uscate. În comparaţie cu procedeul clasic ce utilizează catalizator de cupru, acest proces nu necesită temperaturi înalte sau presiune, nu foloseşte metale grele şi produce mai puţine ape reziduale. Acrilamida rezultată are puritate mai ridicată decât cea obţinută prin procedeul chimic, ceea ce face posibilă utilizarea ei pentru obţinerea unei poliacrilamide cu masă moleculară mai mare. Firma franceză SNF Floerger a cumpărat licenţa pentru acest proces şi va construi 5 instalaţii de fabricare a acrilamidei, fiecare cu capacitatea de 20000 de tone/an.

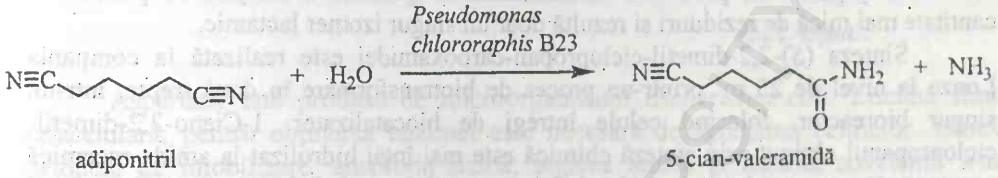
Lonza Guangzou Fine Chemicals din China (filială a companiei Lonza) a început fabricarea nicotinamidei (Niacinamidă, Vitamina B_3) folosind un proces chemoenzimatic. 2-Metil-1,5-diaminopentanul, un produs secundar de la fabricarea nylon-ului este transformat mai întâi în 3-metilpiridină, care este supus unui proces de amonoxidare, formându-se 3-cianopiridina. Acesta este hidrolizat enzimatic la nicotinamidă cu celule imobilizate de *Rhodococcus rhodochrous* J1 (acelaşi catalizator ca în cazul acrilonitrilului). Instalaţia are o capacitate de 3400 tone/an şi utilizează un şir de reactoare cu agitare, alimentarea cu 3-cianopiridină de concentraţie 10-20% făcându-se continuu în sensul fluxului procesului. Conversia este cantitativă, în timp ce procesul chimic ce utilizează un catalizator bazic produce aproximativ 4% produs secundar acid nicotinic. În plus, procesul enzimatic necesită cheltuieli de energie mai mici şi produce un volum mai redus de ape reziduale.



3-ciano-piridină nicotinamidă

5-Cianovaleramida (sau 5-cianopentanamida) este materia primă pentru sinteza anafenidinei, un nou insecticid produs de compania DuPont. Procedeul propus iniţial

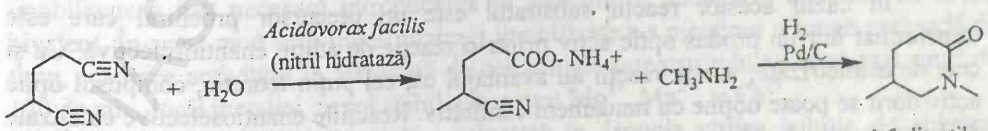
pentru această sinteză a fost unul chimic, hidratarea adiponitrilului folosind bioxidul de mangan drept catalizator însă, la o conversie de numai 25%, aproximativ 20% din adiponitrilul convertit s-a transformat într-un produs secundar, adipamida. Pentru separarea 5-cianovaleramidei de adiponitrilul nereacționat a fost nevoie de un proces complicat, de extracție cu solvenți, iar catalizatorul se inactiva repede. În aceste condiții, a fost elaborat un proces biocatalitic, cu ajutorul căruia s-a reușit reducerea semnificativă a cantităților de produse secundare și deșeuri rezultate și s-a eliminat etapa de purificare a produsului (Thomas, DiCosimo și Nagarajan, 2002). .



adiponitril 5-cian-valeramidă

După testarea mai multor microorganisme care produc o nitril hidratază capabilă să catalizeze reacția de hidratare regioselectivă a adiponitrilului la 5-cianvaleramidă, a fost selectată pe baza stabilității și productivității enzimei bacteria *Pseudomonas chlororaphis* B23 (de la Nitto Chemical Industry, Japonia). Celulele acestui microorganism au fost imobilizate în granule de alginat pentru a favoriza reutilizarea catalizatorului. În varianta inițială industrializată s-au folosit 75,8 kg catalizator (5,8% din masa de reacție) în mediu de reacție apos, pentru a realiza hidratarea a 218 kg adiponitril. Catalizatorul a fost refolosit de 58 de ori cu aceeași rețetă, obținându-se în final 13,6 t de 5-cianvaleramidă cu un randament global de 93% și selectivitate de 96%. Productivitatea biocatalizatorului a fost ridicată, obținând mai mult de 3.150 kg produs raportat la 1 kg biocatalizator (celule uscate). Comparativ cu procesul care utilizează bioxid de mangan, s-a realizat o reducere cu 95% a cantității de catalizator rezidual la un kg de produs.

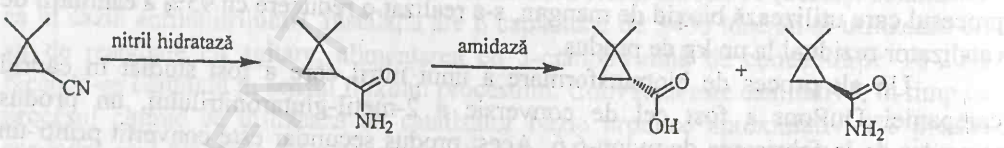
Un alt proces de biotransformare a unui nitril care a fost studiat în cadrul companiei DuPont a fost cel de conversie a 2-metil-glutaronitrilului, un produs secundar de la fabricarea de nylon-6,6. Acest produs secundar este convertit printr-un procedeu chemoenzimatic în 1,5-dimetil-2-piperidonă, un compus cu aplicații în industria electronică, a acoperirilor și ca solvent. 2-Metil-glutaronitrilul este hidrolizat enzimatic la sarea de amoniu a acidului 4-cianopentanoic, utilizând celule imobilizate de *Acidovorax facilis* 72W, care produc o nitril hidratază.



2-metil-glutaronitril 4-cianopentanoat de amoniu 1,5-dimetil-2-piperidonă

Reacția de hidroliză are loc regioselectiv, cu o selectivitate de 98% doar la una dintre grupările nitrilice, obținându-se doar 2% acid 2-metilglutaric ca produs secundar. Concentrația produsului în mediul de reacție a fost cuprins între 170-210 g/l iar productivitatea catalizatorului a fost de cel puțin 1000 kg produs la 1 kg celule uscate, după recirculare de mai multe ori. Sarea de amoniu a acidului 4-cianopentanoic este transformată în 1,5-dimetil-2-piperidonă prin hidrogenare catalitică la presiune joasă în prezență de metilamină. Comparativ cu procedeul chimic în care 2-metil-glutaronitrilul este transformat direct prin hidrogenare catalitică în amestec de 1,3- și 1,5-dimetil-piperidonă, procedeul chemoenzimatic prezintă avantajele că produce o cantitate mai mică de reziduuri și rezultă doar un singur izomer lactamic.

Sinteza (*S*)-2,2-dimetil-ciclopropan-carboxamidei este realizată la compania Lonza la nivel de 25 m^3 printr-un proces de biotransformare în două trepte, într-un singur bioreactor, folosind celule întregi de biocatalizator. 1-Ciano-2,2-dimetil-ciclopropanul obținut prin sinteză chimică este mai întâi hidrolizat la amida racemică corespunzătoare cu ajutorul unei tulpini ce conține o nitril hidratază foarte activă (Rasor și Voss, 2001). Amida este în continuare hidrolizată cu ajutorul unei amidaze obținute din microorganismul *Comomonas acidovorans* și care a fost exprimată în *Escherichia coli,* rezultând o reducere semnificativă a costurilor în comparație cu tulpina originală care era foarte sensibilă. (*S*)-2,2-Dimetil-ciclopropan-carboxamida nehidrolizată reprezintă izomerul dorit, fiind folosită pentru obținerea unui medicament inhibitor de β-lactamază, numit Cilastatin. Reacția se face în soluție apoasă de tampon fosfat de pH 7,0 la 37°C, conținând 7,5% (vol.) metanol. Concentrația substratului este de 2,3% iar timpul de reacție 15 ore. Randamentul de hidroliză este de 47%, iar excesul enantiomeric al produsului de peste 99% (datele sunt pentru sinteza la nivel de laborator). Izomerul inactiv, acidul (*R*)-2,2-dimetil-ciclopropan-carboxilic, este retransformat în amidă racemică prin reacție cu clorură de tionil, apoi amoniac și este recirculat în proces.



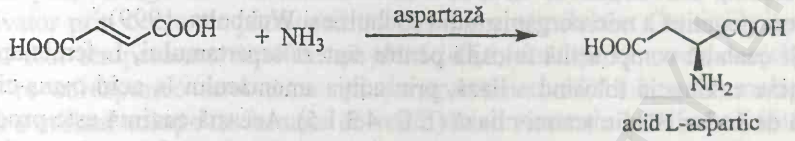
Acid (*R*)-2,2-dimetil-ciclopropan-carboxilic

(*S*)-2,2-dimetil-ciclopropan-carboxamidă

6.5.2. Reacții de sinteză asimetrică realizate cu liaze

În cazul acestor reacții substratul este un precursor prochiral care este transformat într-un produs optic activ printr-o reacție de adiție enantioselectivă. Ca și cele de asimetrizare, aceste reacții au avantajul că, cel puțin teoretic, compusul optic activ dorit se poate obține cu randament cantitativ. Reacțiile enantioselective catalizate de liaze constau în adiția unei substanțe la o dublă legătură, având ca rezultat obținerea unui compus chiral.

Amoniu liazele sunt utilizate industrial pentru sinteza aminoacizilor. Astfel, L-aspartat amoniu liaza din *Escherichia coli* (enzimă numită și aspartază, E.C. 4.3.1.1) catalizează adiția amoniacului la acid fumaric, cu formarea acidului L-aspartic. Acest proces a fost industrializat încă din anii 1970 de compania Tanabe Seiyaku (Japonia) și este utilizat la ora actuală de o serie de alți producători.



acid L-aspartic

Aspartaza este produsă de microorganismul *Escherichia coli.* Enzima fiind intracelulară, pentru obținerea enzimei este necesară dezagregarea celulelor. Dintre metodele de imobilizare, adsorbția fizică, legarea ionică și legarea covalentă s-au dovedit a fi necorespunzătoare, datorită activității reduse a enzimei imobilizate. Entraparea în gel de poliacrilamidă a dus la o activitate destul de bună a enzimei imobilizate (30% din cea a enzimei native) și o stabilitate operațională acceptabilă. Totuși aplicarea industrială a acestei metode nu a fost avantajoasă, întrucît prețul acidului aspartic obținut era prea ridicat.

În aceste condiții s-a studiat posibilitatea utilizării direct a unor celule de *Escherichia coli* imobilizate (Chibata, Tosa și Sato, 1974, Tosa ș.a., 1974). O asemenea imobilizare se poate realiza prin entrapare în gel, incapsulare într-o membrană semipermeabilă de tip poliuree (sintetizată din 2,4-toluilendiizocianat și hexametilendiamină) sau reticulare cu glutaraldehidă sau 2,4-toluilendiizocianat. Inițial, cele mai active preparate s-au obținut prin metoda entrapării în gel de poliacrilamidă reticulat cu N,N'-metilen-bis-acrilamidă. Dimensiunile porilor acestui tip de gel au fost cuprinse între 10-40 Å în medie, ceea ce permitea reținerea celulelor microbiene și în același timp trecerea moleculelor de substrat și produs. Un aspect interesant este acela că în urma contactului cu soluția de substrat, activitatea enzimatică a crescut considerabil, de peste 10 ori după 48 de ore la 37°C. Această activare semnificativă se datorește autolizei pereților celulari, ceea ce duce la creșterea permeabilității membranei celulare față de reactanți și produși. Acestă activare, comparată cu dezactivarea înregistrată în cazul imobilizării enzimei intracelulare extrase, arată superioritatea metodei de imobilizare a celulelor microbiene pentru acest caz.

Pentru a mări stabilitatea operațională a coloanei enzimatice conținând celulele imobilizate a fost necesară introducerea în soluțiile de substrat a unui ion de metal bivalent. În acest mod activitatea enzimei imobilizate s-a menținut o lungă perioadă de timp, scăderea activității la 50% față de cea inițială înregistrîndu-se după mai mult de 120 de zile. Ionii metalici cu rol stabilizator sunt Mg^{2+}, Mn^{2+}, și Ca^{2+}.

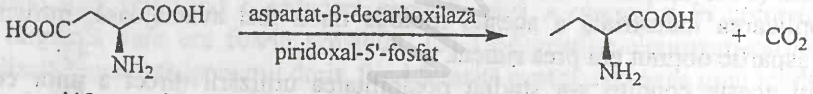
Prima instalație industrială exploatată în Japonia utiliza soluție de substrat (fumarat de amoniu) cu concentrația 1M, la temperatura de 37°C și pH 8,5, în prezență de Mg^{2+}. Separarea produsului din efluentul coloanei enzimatice s-a realizat prin

acidulare cu H_2SO_4 diluat, până la punctul izoelectric (pH 2,8), răcire la 7°C şi filtrare. Randamentul a fost 95% din cel teoretic, iar puritatea produsului foarte bună. Ulterior, procesul a fost îmbunătăţit, utilizând K-carragenan pentru entraparea enzimei, urmată de reticulare cu glutaraldehidă şi hexametilen diamină. În aceste condiţii, timpul de înjumătăţire a activităţii enzimatice a crescut la 680 de zile (Sato ş.a., 1979).

Recent, s-a obţinut o creştere considerabilă a activităţii aspartazei prin modificarea genetică a microorganismului (Schulze şi Wubbolts, 1999).

Şi cealaltă componentă folosită pentru sinteza aspartamului, L-fenilalanina, se poate obţine enzimatic folosind o liază, prin adiţia amoniacului la acid *trans*-cinamic, catalizată de L-fenilalanin amoniu liază (E.C. 4.3.1.5). Această enzimă este produsă de anumite drojdii, de exemplu *Rhodotorula glutinis*. Metoda a fost aplicată la nivel industrial, însă nu s-a dovedit competitivă cu obţinerea L-fenilalaninei prin procedeul fermentativ (Gerhartz, 1990).

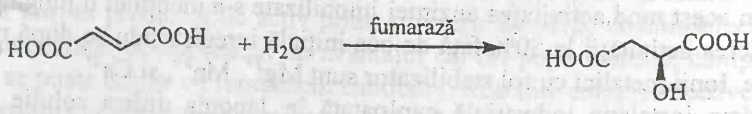
L-alanina s-a fabricat industrial începând din 1965 din acid L-aspartic, folosind celule întregi de *Pseudomonas dacunhae*, care produc o aspartat-β-decarboxilază (E.C. 4.1.1.12), enzimă ce este dependentă de cofactorul piridoxal-5'-fosfat.



acid L-aspartic — L-alanină

Folosind tehnologia enzimatică, s-au obţinut concentraţii de produs de 400 g/l în mediul de reacţie (Gerhartz, 1990). Problema principală pentru trecerea la un sistem continuu a fost formarea bioxidului de carbon în timpul reacţiei. Până la urmă s-a adoptat un reactor continuu tip coloană care lucrează sub presiune ridicată, de 10 kgf/cm^2. Această variantă se aplică industrial din 1982. Dacă se porneşte de la amestecul racemic de acid D,L-aspartic, se obţin concomitent acid D-aspartic şi L-alanină, care se pot separa prin acidularea masei de reacţie, urmată de trecerea pe o coloană cu schimbători de ioni. Acest proces s-a aplicat din anul 1988, folosind de asemenea celule întregi de *Pseudomonas dacunhae* imobilizate. Acidul D-aspartic este materia primă pentru obţinerea unei peniciline semisintetice (Aspoxicillin), care a fost fabricată de asemenea la Tanabe Seiyaku (Shibatani, 1995).

Un alt produs chiral ce se obţine industrial pornind de la acid fumaric şi utilizând o liază este acidul (L)-malic, care se poate sintetiza pe cale biocatalitică prin adiţia apei la acidul fumaric, cu ajutorul fumarat hidratazei, numită şi fumarază (E.C. 4.2.1.2).



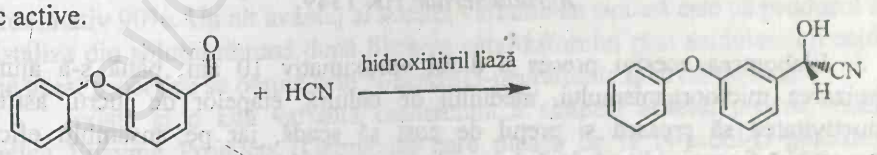
acid L-malic

Și acest proces s-a aplicat industrial la Tanabe Seiyaku Co. începând din anul 1974, iar drept biocatalizator s-au utilizat celulele microbiene de *Brevibacterium ammoniagenes* entrapate în gel de poliacrilamidă, având activitate fumarazică ridicată (Chibata, 1978). Cea mai dificilă problemă a fost prevenirea formării unui produs secundar, acidul succinic, care poate fi separat foarte greu de acidul malic. Acest lucru s-a realizat prin adăugarea unor acizi biliari, care s-au dovedit a avea și un însemnat efect activator prin creșterea permeabilității membranei celulare. Condițiile optime de reacție au fost temperatura de 60°C și pH 7,0-7,5, condiții în care s-a ajuns la un echilibru ce corespunde unei conversii de aproximativ 80% în acid malic. Drept substrat s-a utilizat soluție de fumarat de sodiu de concentrație 1 M, iar acidul fumaric nereacționat s-a separat din efluentul coloanei enzimatice prin acidulare.

Mai târziu, tehnologia a fost modificată în sensul că s-au utilizat celule de *Brevibacterium flavum*, iar entraparea s-a realizat în gel de K-carragenan. În aceste condiții, timpul de înjumătățire a activității biocatalizatorului a crescut la 180 de zile (Takata ș.a., 1980). Un procedeu asemănător a fost brevetat mai recent la compania Amino GmbH (Germania) (Wandrey, Liese și Kihumbu, 2000).

O liază industrială mai recentă este hidroxinitril liaza (oxinitrilaza), care catalizează adiția acidului cianhidric la aldehide și cetone, cu formare de (*S*)-cianhidrine. Cianhidrinele chirale sunt intermediari importanți pentru fabricarea produselor farmaceutice, agrochimice și altor compuși chirali de sinteză fină. Exemple de compuși chirali care se pot obține din aceste cianhidrine sunt acizi 2-hidroxi-carboxilici, 2-hidroxi-aldehide, 2-amino-carboxamide, 2-aminoacizi, 2-aminoalcooli, 2-amino-nitrili și altele. Cianhidrine chirale se pot obține și din compușii racemici corespunzători, folosind reacții de acilare enantioselectivă catalizate de lipaze. Dezavantajul acestor reacții este că fiind vorba de rezoluții cinetice randamentul este limitat teoretic la 50% și din punct de vedere economic este mai rentabilă obținerea lor prin adiția asimetrică a HCN la compușii carbonilici respectivi. Există și procedee industriale care utilizează catalizatori chimici în acest scop, în general însă aceștia au selectivitate redusă și domeniu limitat de substraturi accesibile. Cataliza enzimatică este în aceste condiții tot mai competitivă, reușind să devină o opțiune importantă pentru procesele industriale.

Astfel, compania DSM utilizează o (*S*)-hidroxinitrilază pentru fabricarea cianhidrinei (*S*)-3-fenoxi-benzaldehidei la nivel de tone, pornind de la 3-fenoxi-benzaldehidă. Acest produs este utilizat ca intermediar la fabricarea unor piretroide optic active.



3-fenoxi-benzaldehidă

alcool (S)-α-ciano-3-fenoxibenzilic

Enzima originală (EC 4.1.2.39) a fost izolată din arborele de cauciuc (*Hevea brasiliensis*), însă ea a fost clonată și exprimată într-o serie de microorganisme comune

ca *Escherichia coli* sau *Saccharomyces cerevisiae*, fiind obținută în aceste condiții la un preț mult mai convenabil. Producătorul acestei enzime este Jülich Fine Chemicals GmbH (Germania). Mai recent, ei au reușit să obțină o oxinitrilază (*S*)-selectivă din *Manihot esculenta*, care a fost exprimată tot în tulpini de *Escherichia coli* recombinată. Această enzimă este fabricată la ora actuală la nivel industrial, având termostabilitate ridicată, enantioselectivitate de peste 98% în cazul substraturilor aromatice și de peste 92% în cazul celor alifatice. Ea poate activa atât în mediu apos cât și în solvenți organici (de exemplu diizopropileter), fiind de preferat mediul organic deoarece selectivitatea reacției de adiție a HCN la gruparea carbonil este mai ridicată. (Rosen și Daussmann, 2004).

Un alt procedeu industrial care utilizează o hidratază este fabricarea L-carnitinei, compus care are influență asupra metabolismului grăsimilor și de aceea este un ingredient apreciat al băuturilor pentru sportivi. L-carnitina se fabrică la nivel de 100 t/an la compania Lonza printr-un proces chemoenzimatic ce pleacă de la γ-butirolactonă, care este transformată pe cale chimică în 4-butirobetaină (Schulze și Wubbolts, 1999). Etapa de biotransformare este realizată cu celule întregi ale microorganismului *Agrobacterium* HK1349. Calea metabolică urmată în acest proces este prezentată în Figura 6.8. Are loc dehidrogenarea 4-butirobetainei la acid 4-(trimetilamino)-butenoic în prezența coenzimei A, urmată de adiția apei la acest intermediar sub acțiunea unei liaze specifice. Enzima cheie în acest proces este crotobetainil hidrataza (carnitin dehidrataza, EC 4.2.1.89).

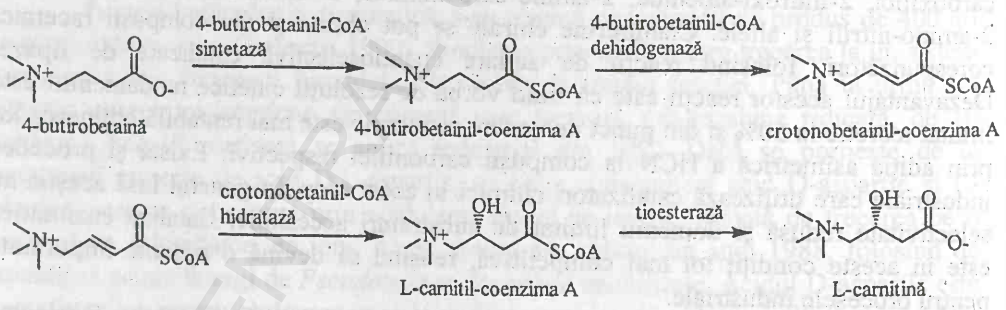
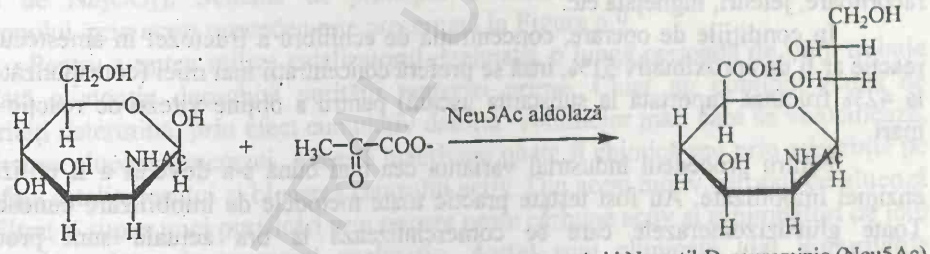


Figura 6.8. Calea metabolică de obținere a L-carnitinei în interiorul celulelor de *Agrobacterium* HK 1349.

Elaborarea acestui proces a durat aproximativ 10 ani, până s-a ajuns la optimizarea microorganismului, mediului de cultură, etapelor de lucru, astfel ca productivitatea să crească și prețul de cost să scadă, iar pe ansamblu eficiența economică să fie mai ridicată decât în cazul procesului chimic.

6.5.3. Sinteza acidului N-acetil-D-neuraminic

Faptul că sinteza chimică a derivaților de hidrați de carbon este foarte complexă face ca obținerea biocatalitică a acestor compuși să fie o posibilitate foarte promițătoare, deoarece nu mai sunt necesare etapele de protecție și deprotecție iar regioselectivitatea reacțiilor poate fi ușor realizată dacă se dispune de catalizatorul adecvat. Un exemplu important aplicat la nivel industrial este acidul N-acetil-D-neuraminic (acid 5-acetamido-3,5-dideoxi-D-glicero-D-manozonulozonic), care reprezintă precursorul principal al medicamentului Zanavir produs de compania GlaxoSmithKline (SUA) pentru tratamentul influenzei. Acesta a fost primul exemplu de reacție catalizată de o aldolază care s-a aplicat industrial (Liese și Filho, 1999). Una dintre principalele probleme a fost legată de obținerea materiei prime pentru această sinteză, N-acetil-D-manozamina (ManNAc), care se obține prin epimerizarea N-acetil-D-glucozaminei (GluNAc) în cataliză bazică, însă echilibrul reacției este nefavorabil (raport ManNAc/GluNAc=1/4), iar GluNAc este inhibitor pentru aldolază. Acest raport nefavorabil a fost îmbunătățit prin precipitarea excesului de GluNAc adăugând 2-propanol la soluția apoasă saturată obținută după epimerizare, iar GluNAc separată se poate recircula la epimerizare. Reacția enzimatică catalizată de aldolază s-a efectuat folosind o aldolază (N-acetilneuraminat liază, EC 4.1.3.3) obținută din tulpini de *Escherichia coli* recombinată, iar soluția obținută după separarea celulelor și dezmembrarea lor pentru eliberarea enzimei s-a supus direct imobilizării pe Eupergit C.



N-acetil-D-manozamină

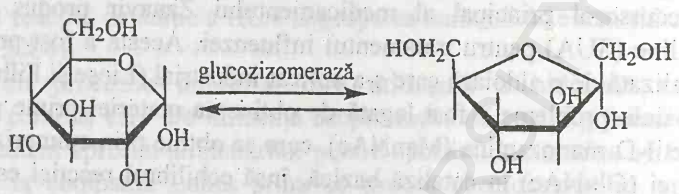
Acid N-acetil-D-neuraminic (Neu5Ac)

Amestecul de reacție este constituit din amestec ManNAc/GluNAc îmbogățit pînă la raport molar de 4:1 și piruvat de sodiu în soluție apoasă, la care se adaugă enzima imobilizată. După un timp de reacție de 46 de ore, conversia în Neu5Ac este de aproximativ 90%. Un alt avantaj al acestei variante de sinteză este că produsul se poate cristaliza din soluția rămasă după filtrarea catalizatorului prin acidulare cu acid acetic. Prin acest procedeu se obține acid N-acetil-D-neuraminic la nivel de tone.

Există și o altă variantă comercială a sintezei acestui produs, realizată la Juelich Enzyme Products (Germania) care pleacă de la N-acetil-D-glucozamină și folosește o a doua enzimă, N-acetil-D-2-glucozamin epimeraza, în combinație cu aldolaza pentru a realiza simultan epimerizarea și condensarea aldolică, utilizând un reactor cu membrană.

6.6. Reacții catalizate de izomeraze

În clasa izomerazelor exemplul cel mai elocvent de utilizare industrială este glucozizomeraza (E.C. 5.3.1.18), utilizată pentru transformarea glucozei în fructoză. Glucozizomerazele sunt produse de o serie de microorganisme ca enzime intracelulare. Varietățile cele mai importante din punct de vedere comercial au o afinitate mai mare pentru xiloză decât pentru glucoză și sunt clasificate în consecință drept xilozizomeraze (E.C. 5.3.1.5).



glucoză fructoză

Fiind o reacție de echilibru, produsul care se obține este un amestec ce conține fructoză, glucoză și o cantitate de oligozaharide. Acest produs are denumirea comercială de izosirop. Izosiropul reprezintă un îndulcitor cu o putere de îndulcire considerabil mai mare decât cea a glucozei și se poate utiliza la fabricarea tuturor produselor ce nu necesită substanță de îndulcire uscată: compoturi, siropuri, băuturi răcoritoare, jeleuri, înghețată etc.

În condițiile de operare, concentrația de echilibru a fructozei în amestecul de reacție ar fi de aproximativ 51%, însă se preferă concentrații mai mici (corespunzătoare la 42% fructoză raportată la substanța uscată) pentru a obține viteze de reacție mai mari.

Pentru procedeul industrial varianta cea mai bună s-a dovedit a fi utilizarea enzimei imobilizate. Au fost testate practic toate metodele de imobilizare cunoscute. Toate glucozizomerazele care se comercializează la ora actuală sunt produse imobilizate, care se prezintă sub forma unor granule cu dimensiunile între 0,1 și 1,5 mm. Ele sunt foarte asemenătătoare ca proprietăți, în ce privește dependența activității de temperatură, de pH și prezența unor ioni metalici. Temperatura optimă se situează în jur de 60°C, iar pH-ul optim în jur de 8,0. Ionii de Mg^{2+}, Co^{2+} și Fe^{3+} le activează în timp ce ionii de Ca^{2+} au efect inhibitor.

În ce privește procesele industriale care utilizează glucozizomerază, ele trebuie să se desfășoare la pH mai mare de 7 pentru ca activitatea enzimei să fie ridicată. La acest pH însă glucoza și fructoza sunt instabile și se descompun ușor cu formare de acizi organici și produse colorate. Din acest motiv, timpul de reacție trebuie redus la minim, ceea ce se realizează prin utilizarea unor concentrații ridicate de enzimă imobilizată. Reacția de izomerizare se face în toate variantele tehnologice în reactoare tip coloană cu strat fix de catalizator, prin care este pompat siropul de glucoză. Pentru ca acest strat să nu se compacteze, granulele trebuie să fie suficient de rigide.

Majoritatea proceselor industriale existente utilizează mai multe reactoare enzimatice, care pot fi legate în paralel sau în serie. Instalațiile cu capacitatea de peste 1000 t izosirop au cel puțin 20 de asemenea reactoare. Diametrul uzual al unui reactor este cuprins între 0,6 și 1,5 m, iar înălțimea umpluturii între 2 și 5 m, astfel ca raportul înălțime-diametru să fie în jur de 3:1 pentru a asigura o distribuție bună a fluxului de fluid ce străbate stratul de catalizator (Gerhartz, 1990).

Pentru procesul care a fost industrializat în S.U.A. (Clinton Corn Processing Co.) s-a ales varianta imobilizării prin legare ionică pe DEAE-celuloză. Enzima provine din culturi de *Streptomyces albus*, iar timpul înjumătățire a activității enzimatice este de mai multe sute de ore. Izomerizarea se face la temperatura de 65°C și pH 8,5. Utilizând acestă tehnologie, în Statele Unite s-au produs în anul 1981 1,25 milioane tone izosirop, izomerizarea glucozei fiind cuplată cu obținerea ei din amidon tot pe cale enzimatică, cu ajutorul amilazelor.

Un alt procedeu industrial a fost elaborat la compania Novo Industri (Danemarca), utilizând glucozizomerază provenită din culturi de *Bacillus coagulans*. Varianta de imobilizare folosită nu este indicată de firmă, însă se pare că ar fi înrețelarea cu glutaraldehidă. Denumirea comercială a acestei glucozizomeraze imobilizate este *Sweetzyme*. Durata de exploatare a enzimei este între 200-360 zile, considerându-se că în acest timp 1 kg enzimă imobilizată poate produce în jur de 15 t izosirop (exprimat ca substanță uscată) la o exploatare în regim continuu în reactor de tip coloană. Temperatura de reacție optimă este 60°C, iar pH-ul optim 7,5 (realizat prin adaos de Na_2CO_3). Schema de principiu a fluxului tehnologic de fabricare a izosiropului prin acest procedeu este prezentată în Figura 6.9.

Pentru a putea utiliza catalizatorul enzimatic o lungă perioadă de timp trebuie acordată o atenție deosebită purității materiei prime. Chiar un conținut redus de impurități determină, prin efect cumulativ datorat volumelor mari care se vehiculează, inactivarea glucozizomerazei. Această inactivare poate fi chimică sau prin adsorbție pe suprafața catalizatorului și blocarea centrului activ. Din acest motiv, siropul de glucoză este filtrat și supus unei purificări prin trecere peste cărbune activ și schimbători de ioni înainte de a intra în reactorul enzimatic. Astfel sunt eliminate atât impuritățile insolubile cât și cele solubile (peptide, aminoacizi, cenușă, etc.). Prezența oxigenului în siropul materie primă duce la formarea unor produse secundare și unele dintre acestea pot determina inhibarea enzimei. De aceea, după încălzirea la temperatura de izomerizare, se face o dezaerare.

După reacția de izomerizare enzimatică se face purificarea și concentrarea produsului. Este indicat ca aceste operații să se desfășoare la pH 4-4,5 pentru a împiedica formarea de produși secundari și de compuși colorați. Purificarea se face prin filtrare și tratare cu cărbune activ, urmată de o a doua filtrare și trecere peste coloană cu schimbători de ioni. Aceste operații sunt efectuate la o temperatură în jur de 60°C. În final se poate face o concentrare sub vid, la temperatura minim posibilă de 70-80°C, pentru a împiedica formarea de produși secundari și colorarea produsului, produsul final având în jur de 70% substanță uscată. O altă posibilitate este ca izosiropul având 42% fructoză obținut după izomerizarea enzimatică să fie îmbogățit în

fructoză până la 55% (raportat la substanța uscată) printr-un procedeu de cromatografie pe coloană. Întrucât produsul rezultat este mai valoros, aproximativ două treimi din producția mondială de izosirop se supun acestui proces de îmbogățire. Produsul concentrat este utilizat mai ales pentru îndulcirea băuturilor nealcoolice.

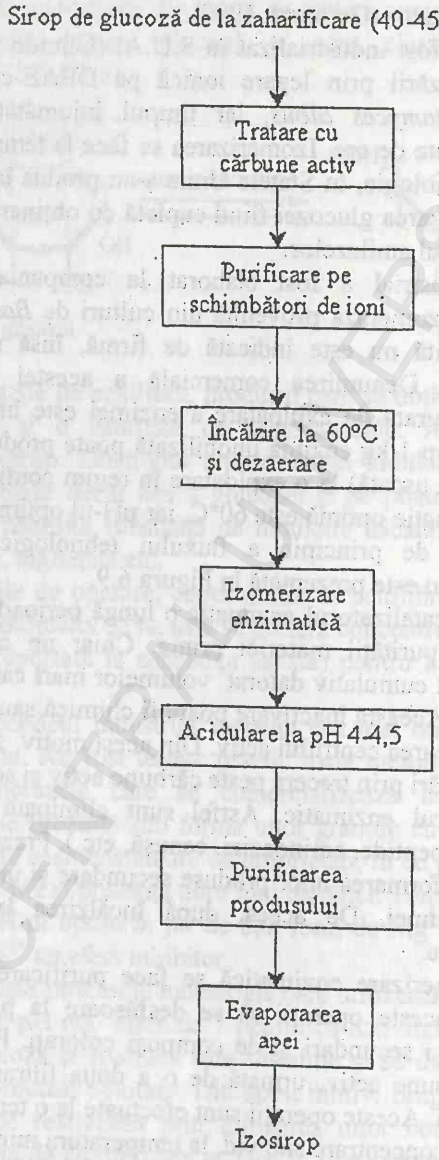


Figura 6.9. Fluxul tehnologic de principiu de la fabricarea izosiropului cu glucozizomerază

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Apariția izosiropului a determinat mutații spectaculoase pe piața substanțelor de îndulcire, izosiropul ajungînd în Statele Unite la o pondere de 60% din totalul acestora, iar în Japonia la 30%. Producția anuală mondială de izosirop este de aproximativ 8 milioane tone. Prețul izosiropului este cu 10-20% mai mic decât cel al zahărului, calculat la aceeaşi putere de îndulcire.

O altă izomerază utilizată la nivel industrial este epimeraza folosită pentru transformarea N-acetil-D-glucozaminei în N-acetil-D-manozamină, ca etapă intermediară în fabricarea acidului N-acetil-D-neuraminic. O posibilitate cu mari perspective de aplicare industrială este utilizarea unei racemaze în tehnologia fabricării aminoacizilor optic activi, în combinație cu acilaza, pentru racemizarea izomerului inactiv din punct de vedere al utilizării farmaceutice. Această tehnologie nu este încă industrializată din cauza stabilității şi activității prea scăzute a racemazei, dar în viitorul apropiat ea se va realiza cu siguranță.

6.7. Reacții catalizate de ligaze

Nu există până la ora actuală exemple cunoscute de utilizări industriale ale ligazelor. Se poate menționa însă rolul important al DNA-ligazelor în ingineria genetică.

6.8. Biotransformări complexe realizate cu microorganisme modificate genetic

Dezvoltarea biocatalizei industriale este legată în mare măsură de utilizarea catalizei în mai multe trepte. Aceasta poate fi realizată cu enzime izolate, eventual co-imobilizate, aşa cum s-a arătat prin câteva exemple, dar şi mai bine cu microorganisme modificate genetic. Aceste microorganisme se obțin prin evoluție direcționată, care a generat o nouă viziune în biotransformările industriale. Până de curând, se testau enzimele existente pe piață iar cea care dădea rezultate mai bune era destinată utilizării industriale. La ora actuală este posibilă obținerea enzimei dorite pentru o anumită aplicație prin evoluție direcționată, sau chiar a unui microorganism care să realizeze o secvență dorită de biotransformări în interiorul celulei.

Exemplul cel mai spectaculos în acest sens este obținerea 1,3-propandiolului din glucoză. Obținerea pe cale biotehnologică a 1,3-propandiolului dintr-o sursă de materii prime reînnoibilă, glucoza, a trezit un interes deosebit în ultimii ani. Deşi se cunoaşte de mult faptul că polimerii pe bază de 1,3-propandiol au proprietăți unice, lipsa unui procedeu chimic avantajos de sinteză a acestui compus a împiedicat pînă acum dezvoltarea sa extensivă. La ora actuală se pare că această problemă va fi rezolvată, deoarece s-a obținut o tulpină de *Escherichia coli* recombinată la care s-a reuşit cuplarea a două căi metabolice: una pentru conversia glucozei la glicerină şi a doua pentru conversia glicerinei la 1,3-propandiol. Pentru aceasta metabolismul microorganismului gazdă a trebuit fundamental modificat, întrucât în mod normal acesta produce doar dihidroxiacetona ca metabolit al glucozei. A fost necesară

importarea unor gene din drojdie pentru a realiza transformarea dihidroxiacetonei în glicerină şi dintr-o bacterie, *Klebsiella pneumoniae,* pentru transformarea glicerinei în 1,3-propandiol. În acest mod, productivitatea biocatalizatorului a crescut de peste 500 de ori, iar celula de *E. coli* se transformă într-o mică uzină de fabricat 1,3-propandiol (Figura 6.10).

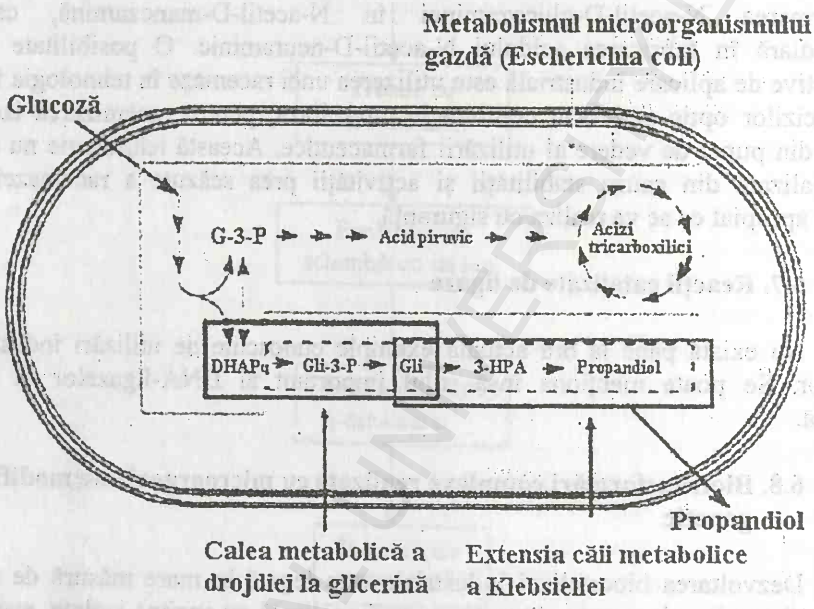


Figura 6.10. Calea metabolică de producere a 1,3-propandiolului din glucoză (Genencor International); G-3-P = glucozo-3-fosfat; DHAP = dihidroxiaceton-fosfat; Gli-3-P = glicero-3-fosfat; Gli = glicerină; 3-HPA = acid 3-hidroxipropanoic.

S-a obţinut o concentraţie de 135 g/l produs în mediul de cultură şi un randament de transformare de 51% în produsul dorit (Sanford, Valle şi Ghirnikar, 2004). Cercetările pentru industrializare sunt într-o fază foarte avansată la compania DuPont în colaborare cu Genencor (S.U.A.), 1,3-propandiolul fiind utilizat pentru fabricarea unui poliester cu acidul tereftalic, politrimetilen-tereftalatul, cu proprietăţi deosebite. Instalaţia existentă la ora actuală în Kinston (Carolina de Nord) care fabrică 1,3-propandiol din materii prime petrochimice urmează să treacă la această biotehnologie. Începerea producţiei industriale a fost prevăzută pentru anul 2003.

6.9. Perspectivele biocatalizei industriale

Posibilitatea de a se evita reacţiile paralele şi consecutive nedorite în urma modificărilor genetice va determina o dezvoltare deosebită a biotransformărilor realizate cu celule întregi. Obţinerea unor microorganisme mai rezistente la solvenţi

organici va duce la posibilitatea de a diversifica reacțiile enzimatice în solvenți organici. Evoluția direcționată este o nouă metodă revoluționară în biotehnologie, care împreună cu metodele perfecționate de testare a activității va determina scurtarea considerabilă a timpului de obținere și a costului a unor biocatalizatori noi, majoritatea "croiți" direct pe o anumită aplicație.

La ora actuală includerea unei etape de biocataliză într-un proces de sinteză fină este considerată din ce în ce mai mult o variantă avantajoasă, întrucât numărul de biocatalizatori accesibili a crescut foarte mult iar utilizarea lor nu prezintă nici un fel de dificultăți suplimentare comparativ cu catalizatorii obișnuiți. Va crește și numărul proceselor de biotransformare complexe, care realizează o serie întreagă de transformări, mai ales că acestea au avantajul că pleacă în general de la materii prime simple și ieftine. Viitorul apropiat însă va fi dominat probabil de integrarea reacțiilor catalizate de enzime în procesele de sinteză tradiționale.

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BIBLIOGRAFIE

Adelhorst, K., Björkling, F., Godtfredsen, S.E., Kirk, O. (1990). Enzyme catalysed preparation of 6-*O*-acylglucopyranosides. *Synthesis*, **2**, 112-115.

Adlercreutz, P. (1994). Enzyme-catalysed lipid modification, în *Biotechnoogy and Genetic Engineering Reviews*, **Vol. 12** (editor Tombs, M.P.), Intercept Ltd., Andover (U.K.), 231-254.

Adlercreutz, P. (1996). Modes of using enzymes in organic media, în *Enzymatic reactions in organic media* (editori Koskinen, A.M.P., Klibanov, A.M.), Chapman&Hall, London, 9-42.

Adoga, G., Mattey, M. (1979). Properties of an extracellular peptide with esterase activity produced by *Candida lipolytica*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **6**, 61-63.

Affleck, R., Xu, Z., Suzawa, V., Focht, K., Clark, D. S., Dordick, J.S. (1992). Enzymatic catalysis and dynamics in low-water environments. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, **89**, 1100-1104.

Aisaka, K., Terada, O. (1981). Purification and properties of lipase from *Rhizopus japonicus*. *J. Biochem.*, **89**, 817-822.

Akoh, C.C. (1994). Enzymatic synthesis of acetylated glucose fatty acid esters in organic solvent. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**, 319-323.

Akoh, C.C. (1996). Enzymatic modification of lipids, în *Food Lipids and Health* (editori Mc Donald, R.E., Min, D.B.), Marcel Dekker, NewYork, 117-138.

Akova A., Ustun, G. (2000). Activity and adsorption of lipase from *Nigella sativa* seeds on Celite at different pH values. *Biotechnol. Lett.*, **22**, 355-359.

Andersson, R.E. (1980). Concentration and partial purification of lipase from *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnol.Lett.*, **2**, 247-252.

Anthonsen, H.W., Baptista, A., Drablos, F., Martel, P., Petersen, S.B., Sebastiao, M., Vaz, L. (1995). Lipases and esterases: a review of their sequences, structure, and evolution, în *Biotechnology Annual Review* (editor El-Gewely, M.R.), Elsevier, Amsterdam, 315-371.

Axen, R., Porath, J., Erback, S. (1967). Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature*, **214**, 1302-1304.

Azerad, R. (1995). Application of biocatalysts in organic synthesis. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **132**, 17-51.

Bacaloglu, R., Musca, G., Pop, G., Peter, F. (1985). A kinetic study of the glycerol esterification with oleic acid catalysed by pancreatic lipase. *Rev. Roum. Biochim.*, **22**, 177-181.

Backlund, S., Eriksson, F., Kanerva, L.T., Rantala, M. (1995). Selective enzymatic reactions using microemulsion-based gels. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, **4**, 121-127.

Bailie, P.M., McNerlan, S.E., Robinson, E., Murphy, W.R. (1995). The immobilisation of lipases for hydrolysis of fats and oils. *Trans IChemE*, **73**, Part C, 71-76.

Baillargeon, M.W. (1990). Purification and specificity of lipases from *Geothricum candidum*. *Lipids*, **25**, 841-848.

Bar, R. (1986). Phase toxicity in multiphase biocatalysis. *Trends Biotechnol.*, **4**, 167.

Barth, S., Effenberger, F. (1993). Lipase-catalyzed resolution of racemic 2-alkyl substituted 1-alkanols. *Tetrahedron: Asym.*, **4**, 823-827.

Bell, G., Todd, J.R. (1981). Hydrolysis of triglyceride by solid phase lipolytic enzymes of *Rhizopus arrhizus* in continuous reactor system. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1703-1719.

Benkouka, F., Guidoni, A., De Caro, J., Bonicel, J., Desnuelle, P., Rovery, M. (1982). Porcine pancreatic lipase. The disulfide bridges and the sulfhydryl groups. *Eur. J. Biochem.*, **128**, 331-341.

Benzonana, G. (1974). Some properties of an exocellular lipase from *Rhizopus arrhizus*. *Lipids*, **9**, 166-172.

Benzonana, G., Desnuelle, P. (1965). Kinetic study of the action of pancreatic lipase on emulsified triglycerides. Enzymology assay in heterogeneous medium. *Biochim. Biophys. Acta*, **105**, 121-136.

Benzonana, G., Esposito, S. (1971). On the positional and chain specificities of *Candida cylindracea* lipase. *Biochim. Biophys. Acta*, **231**, 15-22.

Bernfeld, P., Wan, J. (1963). Antigens and enzymes made insoluble by entrapping them into lattices of synthetic polymers. *Science* **142**, 678-679.

Bezáková, L., Kovács P. (1981). A contribution to the assesment of pancreatic lipase and esterase. *Biochem. Chim. Bohemoslav.*, **10**, 149-155.

Bier, M. (1955). Pancreatic lipase, *Methods Enzymol.*, **1**, 627-642.

Bloomer, S., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1992a). Facile synthesis of fatty acid esters in high yield. *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 546-551.

Bloomer, S., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1992b). Kilogram-scale ester synthesis of acyl donor and use in lipase-catalyzed interesterifications. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 66-973.

Bloquel, R., Veillet-Poncet, L. (1984). Factors contributing to production of microbial lipases. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, **2**, 179-185.

Blow, D. (1991). Lipases reach the surface. *Nature*, **351**, 444-445.

Bódai, V., Peredi, R., Bálint, J., Egri, G., Novák, L., Szakács, G., Poppe, L. (2003). Novel hydrolases from thermophilic filamentous fungi for enantiomerically and enatiotopically selective biotransformations. *Adv. Synth. Catal.*, **345**, 811-818.

Bodnar, J., Gubicza, L., Szabo, L.P. (1990). Enantiomeric separation of 2-chloropropionic acid by enzymatic esterification in organic solvents. *J. Mol. Catal.*, **61**, 353-361.

Bommarius, A.S., Riebel, B.R. (2004). *Biocatalysis*, Wiley VCH, Weinheim.

Bornscheuer, U.T. (1995). Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols. *Enzyme Microb. Technol.*, **17**, 578-586.

Bornscheuer, U.T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties, and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, **26**, 73-81.

Borzeix, F., Monot, F., Vandecasteele, J.P. (1992). Strategies for enzymatic esterification in organic solvents: comparison of microaqueous, biphasic, and miceller systems. *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 791-796.

Brahimi-Horn, M.C., Guglielmino, M.L., Elling, L., Sparrow, L.G. (1990). The esterase profile of a lipase from *Candida cylindracea*. *Biochim. Biophys. Acta,* **1042**, 51-54.

Brahimi-Horn, M.C., Guglielmino, M.L., Sparrow, L.G. (1989). Wax esterase activity in a comercially available source of lipase from *Candida lipolytica*. *J. Biotechnol.*, **12**, 299-306.

Braun, S., Rappoport, S., Zusman, R., Avnir, D., Ottolenghi, M. (1990). Biochemically active sol-gel glasses: the trapping of enzymes. *Mat. Lett.*, **10**, 1-5.

Breuil, C., Kushner, D.J. (1975). Partial purification and characterization of lipase of a facultatively psychrophilic bacterium (*Acinetobacter* O_{16}) *Can. J. Microbiol.*, **21**, 434-441.

Breuil, C., Kushner, D.J (1975). Lipase and esterase formation by psychrophilic and mesophilic *Acinetobacter* species. *Can. J. Microbiol.*, **21**, 423-433.

Brockerhoff, H. (1974). Lipolytic enzymes, în *Advances in Chemistry Series, No.136, Food Related Enzymes*, American Chemical Society, New York, 131-145.

Brockerhoff, H. (1974). Regulation of enzyme activity by enzyme orientation: a hypothesis. *Bioorg.Chem.*, **3**, 176-183.

Brockman, H.L., Law, J.H., Kézdy, F.J. (1973). Catalysis by adsorbed enzymes. *J. Biol. Chem.*, **248** (14), 4965-4970.

Brockmann, H.L. (1981). Triglyceride lipase from porcine pancreas. *Methods Enzymol.*, **71**, 619-627.

Broun, G.B. (1976). Chemically aggregated enzymes. *Methods Enzymol.*, **44**, 263-280.

Brümmer, W., Gunzer, G. (1987). Laboratory techniques of enzyme recovery, în *Biotehnology,* **Vol. 7a**, *Enzyme Technology* (editor Kennedy, J.F.), Verlag Chemie, Weinheim, 213-278.

Brümmer, W., Hennrich, N., Klockow, M., Lang, H., Orth, H.D. (1972). Preparation and properties of carrier-bound enzymes. *Eur. J. Biochem.* **25**, 129-135.

Brzozowski, A.M., Derewenda, U., Derewenda, Z.S., Dodson, G.G., Lawson, D.M., Turkenberg, J.P., Bjorkling, F., Huge-Jensen, B., Patkar, S.A., Thim, L. (1991). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, **351**, 492-497.

Burke, P.A., Griffin, R.G., Klibanov, A.M. (1992). Solid state NMR-assessment of enzyme active center structure under non-aqueous conditions. *J. Biol. Chem.*, **267**(28), 20057-20064.

Cambou, B., Klibanov, A.M. (1984). Comparison of different strategies for the lipase-catalyzed preparative resolution of racemic acids and alcohols: asymmetric hydrolysis, esterification, and transesterification. *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 1449-1454.

Cantarelli, C. (1984). Enzimi per l'industria alimentare, *Industrie Alimentari*, 845-852.

Capewell, A., Wendel, V., Bornscheuer, U., Meyer, H.H., Scheper, T. (1996). Lipase-catalyzed kinetic resolution of 3-hydroxy esters in organic solvents and supercritical carbon dioxide. *Enzyme Microb. Technol.*, **19**, 181-186.

Carrea, G., Ottolina, G., Riva, S., Secundo, F. (1992). Effect of reaction conditions on the activity and enantioselectivity of lipases in organic solvents, în *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (editor Tramper J. ş.a.), *Progress in Biotechnology*, **Vol. 8**, Elsevier, Amsterdam, 111-119.

Carta, G., Gainer, J.L., Benton, A.H. (1991). Enzymatic synthesis of esters using an immobilized lipase. *Biotehnol .Bioeng.* **37**, 1004-1009.

Carta, G., Gainer, J.L., Gibson, M.E. (1992). Synthesis of esters using a nylon-immobilized lipase in batch and continuous reactors. *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 904-909.

Ceynowa, J., Sionkowska, I. (1993). Enantioselective esterification of butanol-2 in an enzyme membrane reactor. *Acta Biotechnol.* **13**, 177-183.

Chander, H., Klostermeyer, H. (1982). Factors affecting lipase production in *Mucor mucedo. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.* **C3**, 427-431.

Chang, T.M.S. (1976). Microencapsulation of enzymes and biologicals. *Methods Enzymol.*, **44**, 201-218.

Chapus, C., Semerivà, M. (1976). Mechanism of pancreatic lipase action. 2. Catalytic properties of modified lipases. *Biochemistry* **15**, 4988-4991.

Chen, C.-S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G., Sih, C.J. (1982). Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7294-7299.

Chibata, I., Tosa, T. (1981). Use of immobilized cells. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **10**, 197-216.

Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., Mori, T (1976). Production of L-amino-acids by aminoacylase adsorbed on DEAE-Sephadex. *Methods Enzymol.*, **44**, 746-759.

Chinski, N., Margolin, A.L., Klibanov, A.M. (1989). Chemoselective enzymatic monoacylation of bifunctional compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 386-388.

Chiou, S.-H., Wu, W.-T. (2004). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*, **25**, 197-204.

Chrisocou, A., Schaber, K. (1996). Design of a supercrtitical fluid extraction process for separating mixtures incurred in enzyme-catalyzed reactions. *Chem. Eng. Process.*, **35**, 271-282.

Clapes, P., Adlercreutz, P. (1991). Substrate specificity of α-chimotrypsin-catalyzed esterification in organic media. *Biochim. Biophys. Acta*, **1118**, 70-76.

Clement, G.E., Bender, M.L. (1963). The effect of aprotic dipolar organic solvents on the kinetics of α-chymotripsin catalyzed hydrolyses. *Biochemistry*, **2**, 836-843.

Copeland, R.A. (1996). *Enzymes. A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. VCH Publishers, New York.

Cornish-Bowden A. (1984). Enzyme kinetics, în *Comprehensive Biotehnology*, **Vol.1**, *Section 2: Chemical and Biological Fundamentals* (editor Moo Young, M.), Pergamon Press, New York, 521-538.

Cornish-Bowden A. (1995). *Analysis of enzyme kinetics data*, Oxford University Press, Oxford (U.K.).

Cruces, M.A., Otero, C., Bernabe, M., Martin-Lomas, M., Ballesteros, A. (1992). Enzymatic preparation of acylated sucroses, în *Enzyme Engineering XI, Annals of the New York Academy of Sciences,* **Vol. 672**, New York, 436-443.

Cygler, M., Grochulski, P., Schrag, J.D. (1995). Structural determinants defining common stereoselectivity of lipases toward secondary alcohols. *Can. J. Microbiol.* **41**(suppl. 1), 289-296.

Davies, H.G., Green, R.H., Kelly, D.R., Roberts, S.M. (1989). *Biotransformations in Preparative Organic Chemistry*, Academic Press, London.

Davis, B.J., Boyer, V. (2001). Biocatalysts and enzymes in organic synthesis. *Nat. Prod. Rep.*, **18**, 618-640.

De Caro, J., Boudouard, M., Bonicel, J., Guidoni, A., Desnuelle, P., Rovery, M. (1981). Porcine pancreatic lipase. Completion of the primary structure. *Biochim. Biophys. Acta,* **671**, 129-138.

De Caro, J., Guidoni, A., Bonicel, J., Rovery, M. (1989). The histidines reacting with ethoxyformic anhydride in porcine pancreatic lipase: their relationship with enzyme activity. *Biochimie,* **71**, 1211-1219.

De Goede, A.T.J.W., van Oosterom, M., van Deuzen, M.P.J., Sheldon, R.A., van Bekkum, H., van Rantwijk, F. (1994). Selective lipase-catalyzed esterification of alkyl glycosides. *Biocatalysis,* **9**, 145-155.

De Oliveira, P.D., Alves, G.M., de Castro H.F. (2000). Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer. *Biochem. Eng. J.*, **5**, 63-71.

De Renobales, M., Agud, I., Lascary, J.M., Mugica, J.C., Landeta, L.C., Solozabal, R. (1992). Hydrolysis of animal fats by lipase at temperatures below their melting points. *Biotechnol. Lett.* **14**, 683-688.

Deleuze, H., Langrand, G., Millet, H., Baratti, J., Buono, G., Triantaphylides, C. (1987). Lipase-catalyzed reactions in organic media: competition and applications. *Biochim. Biophys. Acta*, **911**, 117-120.

DeMoraes, J., Chandan, R.C. (1982). Factors influencing the production and activity of *Streptococcus thermophilus* lipase. *J.Food Sci.,* **47**, 1579-1583.

DeSantis, G., Jones, J.B. (1999). Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Curr. Opin. Biotechnol.,* **10**, 324-330.

Dibkaer, R. (2002). The tortuous road to the adoption of katal for the expression of catalytic activity by the General Conference of Weights and Measures. *Clin. Chem.*, **48**, 586-590.

Dickey, F.H. (1955). Specific adsorption. *J. Phys. Chem.*, **58**, 695-707.

Dinelli, D., Marconi, W., Morisi, F. (1976). Fiber-entrapped enzymes. *Methods Enzymol.*, **44**, 227-243.

Dordick, J.S. (1992). Enzymatic and chemoenzymatic approaches to polymer synthesis. *Trends Biotechnol.,* **10**, 287-293.

Doumèche, B., Heinemann, M., Büchs, J., Hartmeier, W., Anserge-Schumacher, M.B.(2002). Enzymatic catalysis in gel-stabilized two-phase systems: improvement of the solvent phase. *J. Mol. Catal. B:Enzymatic*, **18**, 19-27.

Drauz, K., Waldmann, H. (1995). *Enzyme catalysis in organic synthesis. A comprehensive handbook*, Wiley-VCH, Weinheim.

Drew, S., Wang, D.I.C., Blanch, H.W. (1984). The practice of biotechnology: bulk commodity products, în *Comprehensive Biotehnology* (editor Moo Young, M.), **Vol.3**, Pergamon Press, New York, 830-835.

Dumitru, I.F., Iordăchescu, D. (1981). *Introducere în enzimologie*. Ed. Medicală, Bucureşti.

Dumont, T., Barth, D., Corbier, C., Branlant, G., Perrut, M. (1992). Enzymatic reaction kinetic: comparison in an organic solvent and in supercritical carbon dioxide. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 329-333.

Egri, G., Bálint, J., Peredi, R., Fogassy, E., Novák, L., Poppe, L. (2000). Lipase-catalyzed enatiotope selective acetylation of 2-acyloxypropane-1,3-diols. Influence of the acyl moiety on the selectivity. *J. Molec. Cat. B: Enzymatic*, **10**, 583-596.

Engel, P.C. (1981). *Enzyme Kinetics. The Steady-State Approach*, Ediția a 2-a, Chapman and Hall, London.

Erlanson-Albertsson, C., Akerlund, H.E. (1982). Conformational change in pancreatic lipase induced by colipase *FEBS Lett.*, **144**, 38-42.

Faber, K. (1995). *Biotransformations in Organic Chemistry*, Ediția a 2-a, Springer-Verlag, Heidelberg.

Fadnavis, N.W., Sheelu, G., Kumar, B.M., Bhalerao, M.U., Deshpande, A.A. (2003). Gelatin blends with alginate: gels for lipase immobilization and purification. *Biotechnol. Prog.*, **19**, 557-564.

Falb, R.D., Lynn, J., Shapira J. (1973). Enzyme-polymer adducts of aldolase, glyceraldehydephosphate dehydrogenase, and fructosediphosphatase. *Experientia*, **28**, 958-959.

Ferdinand, W. (1976). *The enzyme molecule*. John Wiley, Chichester (U.K.).

Fernandez-Lafuente, R., Armisen, P., Sabuquillo, P., Fernadez-Lorente, G., Guisan, J.M. (1998). Immobilization of lipases by selective adsorbtion on hydrophobic supports. *Chem. Phys. Lipids*, **93**, 185-197.

Ferreira-Dias, S., de Fonseca, M.M.R. (1995). Production of monoglycerides by glycerolysis of olive oil with immobilized lipases: effect of the water activity. *Bioprocess Engineering*, **12**, 327-337.

Fielding, P.E., Shore, V.G., Fielding, C.J. (1974). Lipoprotein lipase: properties of the enzyme isolated from post-heparin plasma. *Biochemistry*, **13**, 4318-4323.

Fletcher, P.D.I., Robinson, B.H., Freedman, R.B., Olfield, C. (1985). Activity of lipase in water in oil microemulsions. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I.*, **81**, 2667-2679.

Foelsche, E., Hickel, A., Hönig, H., Seufer-Wasserthal, P. (1990). Lipase–catalyzed resolution of acyclic amino alcohol precursors. *J. Org. Chem.* **55**, 749-1753.

Fontayn, F., Lognay, G., Marlier, M. (1995). Flavouring esters synthesis catalysed by lipases in organic solvents. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent,* **60/4a**, 1969-1975.

Forssell, P., Kervinen, R., Lappi, M., Linko, P., Suortti, T., Poutanen, K. (1992). Effect of enzymatic interesterification on the melting point of tallow-rapeseed oil mixture. *J. Am.Oil Chem. Soc.* **69**, 126-129.

Fregrapane, G., Sarney, D.B., Greenberg, S.G., Knight, D.J., Vulfson, E.N. (1992). Chemo-enzymatic synthesis of monosaccharide fatty acid esters and their preliminary characterisation, în *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (editor Tramper J. ş.a.), *Progress in Biotechnology,* **Vol. 8**, Elsevier, Amsterdam, 563-568.

Fregrapane, G., Sarney, D.B., Greenberg, S.G., Knight, D.J., Vulfson, E.N. (1994). Enzymatic synthesis of monosaccharide fatty acid esters and their comparison with conventional products. *J. Am.Oil Chem. Soc.* **71**, 87-91.

Fregrapane, G., Sarney, D.B., Vulfson, E.N. (1991). Enzymic solvent-free synthesis of sugar acetal fatty acid esters. *Enzyme Microb.Technol.* **13**, 796-800.

Fregrapane, G., Sarney, D.B., Vulfson, E.N. (1994). Facile chemo-enzymatic synthesis of monosaccharide fatty acid esters. *Biocatalysis,* **11**, 9-18.

Frost, G.M., Moss, D.A. (1987). Production of enzymes by fermentation, în *Biotechnology,* **Vol. 7a**, *Enzyme Technology* (editor Kennedy, J.F.), Verlag Chemie, Weinheim, 65-212.

Fukui, S., Sonomoto, K., Tanaka, A. (1987). Entrapment of biocatalysts with photo-cross-linkable resin prepolymers and urethane resin prepolymers. *Methods Enzymol.*, **135**, 230-252.

Fukunaga, K., Minamijima, N., Sugimura, Y., Zhang, Z., Nakao K. (1996). Immobilization of organic solvent-soluble lipase in nonaqueous conditions and properties of the immobilized enzymes. *J. Biotechnol.*, **52**, 81–88.

Gerlach, D., Lutz, D., Mey, B., Schreyer, P. (1989). Enantioselective lipase catalyzed esterification in organic medium for preparation of optically active secondary alcohols. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **189**,141-143.

Ghoshray, S., Battacharya, D.K. (1992). Enzymatic preparation of ricinoleic acid esters of long-chain monohydric alcohols and properties of the esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 85-89.

Gill, I. (2001). Bio-doped nanocomposite polymers: sol-gel bioencapsulates. *Chem. Mat.*, **13**, 3404-3421.

Gill, I., Ballesteros, A. (2000). Bioencapsulation within synthetic polymers (Part I): sol-gel encapsulated biologicals. *Trends Biotechnol.*, **18**, 282-296.

Gill, I., Pastor, E., Ballesteros, A. (1999). Lipase-silicon biocomposites: efficient and versatile immobilized biocatalysts. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9487-9496.

Giuseppin, M.L.F. (1984). Effects of dissolved oxygen concentration on lipase production by *Rhizopus delemar*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 161-165.

Glowacz, G., Barislowich, M., Linke, M., Richter, P., Fuchs, C., Mörsel, J.T. (1996). Stereoselectivity of lipases in supercritical carbon dioxide. I. Dependence of regio- and enantioselectivity of porcine pancreatic lipase on the water content

during the hydrolysis of triolein and its partial glycerides. *Chem. Phys. Lipids,* 79, 101-106.

Gololobov, M.Y., Voyushina, T.L., Stepanov, V.M., Adlercreutz, P. (1992). Organic solvent changes the chymotrypsin specificity with respect to nucleophiles. *FEBS Lett.*, **307**, 309-312.

Gorman, L.A.S., Dordick, J.S. (1992). Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 392-397.

Gregoriadis, G., Leathwood, P.D., Ryman, B.E. (1971). Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett.*, **14**, 95-99.

Grubhofer, N., Schleith, L. (1954). Protein coupling with diazotized polyaminostyrene. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **297**, 108-112.

Gubicza, L. (1992). Effect of the solvent on enzyme enantioselectivity, în *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (editor Tramper J. ş.a.), *Progress in Biotechnology,* **Vol. 8**, Elsevier, Amsterdam, 497-503.

Gubicza, L., Kelemen-Horváth, I. (1993). Effect of water-mimicking additives on the synthetic activity and enentioselectivity in organic solvents of a *Candida cylindracea* lipase. *J. Mol. Catal.*, **84**, L27-L32.

Gubicza, L., Szakács-Schmidt, A. (1994). Effects of the reaction conditions on the enantioselective esterification using *Candida cylindracea* lipase. *Biocatalysis*, **9**, 131-143.

Gubicza, L., Szakács-Schmidt, A. (1995). On-line water removal during enzymatic asymmetric esterification in organic media. *Biotechnol.Tech.*, **9**, 687-690.

Gubicza, L., Szakács-Schmidt, A. (1995). Production of bioflavours by lipase-catalyzed esterification in organic solvents. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent,* **60/4a**, 1977-1982.

Gunstone, F.D. (1990). Chemical reactions of oils and fats. *Biochem.Soc.Trans.*, **17**, 1141-1145.

Haferburg, D., Kleber, H.P. (1982). Extrazelluläre lipase aus *Acinetobacter calcoaceticus. Acta Biotechnologica,* **2**, 337-342.

Halling, P.J. (1989). Lipase-catalysed reactions in low water organic media: effects of water activity and chemical modification. *Biochem. Soc. Trans.* **17**, 1142-1145.

Halling, P.J. (1994). Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 178-206.

Han, D., Rhee, J.S., Lee, S.B. (1987). Lipase reaction in AOT-isooctane reversed micelles: effect of water on equilibria. *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 381-388.

Hansen, T.V., Waagen, V., Partali, V., Antonsen, H.W., Anthonsen, T. (1995). Co-solvent enhancement of enantioselectivity in lipase-catalysed hydrolysis of racemic esters. A process for production of homochiral C-3 buiding blocks using lipase B from *Candida antarctica. Tetrahedron: Asymmetry,* **6**, 499-504.

Hata, Y., Matsuura, Y., Tanaka, N., Kakudo, M., Sugihara, A., Iwai, M., Tsujisaka, Y. (1979). Low resolution crystal structure of lipase from *Geothricum candidum* (ATCC34614). *J. Biochem.*, **86**, 1821-1827.

Hayes, D.G., Gulari, E. (1991). 1-Monoglyceride production from lipase-catalyzed esterification of glycerol and fatty acid in reverse micelles. *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 507-517.

Hench, L.L., West, J.K. (1990). The sol-gel process. *Chem. Rev.*, **90**, 33-72.

Hills, M.J., Kiewitt, I., Mukherjee, K.D. (1989). Enzymatic fractionation of evening primrose oil by rape lipase: enrichment of γ-linolenic acid. *Biotechnol. Lett.*, **11**, 629-632.

Hills, M.J., Kiewitt, I., Mukherjee, K.D. (1990a). Lipase from *Brassica napus* L. discriminates against *cis*-4 and *cis*-6 unsaturated fatty acids and secondary and tertiary alcohols. *Biochim. Biophys. Acta*, **1042**, 237-240.

Hills, M.J., Kiewitt, I., Mukherjee, K.D. (1990b). Enzymatic fractionation of fatty acids: enrichment of γ-linoleic acid docosahexaenoic acid by selective esterification catalyzed by lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **67**, 561-564.

Höfelmann, M., Hartmann, J., Zink, A., Schreier, P. (1985). Isolation, purification, and characterization of lipase isoenzymes from a technical *Aspergillus niger* enzyme. *J. Food Sci.*, **50**, 1721-1725.

Holmberg, E., Dahlen, E., Norin, T., Hult, K. (1991). Enhanced resolution of a secondary alcohol by hydrolysis of a bichiral ester catalyzed by lipase from *Candida cylindracea*. *Biocatalysis*, **4**, 305-312.

Hönig, H., Seufer-Wasserthal, P. (1990). A general method for the separation of enantiomeric *trans*-2-substituted cyclohexanols. *Synthesis*, **12**, 1137-1139.

Huang, K.H., Akoh, C.C. (1996). Enzymatic synthesis of structured lipids: transesterification of triolein and caprylic acid ethyl ester. *J. Am.Oil Chem. Soc.*, **73**, 245-250.

Huge-Jensen, B., Andreasen, F., Christensen, T., Christensen, M., Thim, L., Boel, E. (1989). *Rhizomucor miehei* triglyceride lipase is processed and secreted from transformed *Aspergillus oryzae*. *Lipids*, **24**, 781-789.

Huge-Jensen, B., Galuzzo, D.R., Jensen, R.G. (1987). Partial purification and characterization of free and immobilized lipases from Mucor miehei. *Lipids*, **22**, 559-565.

Hughes, D.L., Bergan, J.J., Amato, J.S., Bhupathy, M., Leazer, J.L., McNamara, J.M., Sidler, D.R., Reider, P.J., Grabowski, E.J.J. (1991). Lipase-catalyzed asymmetric hydrolysis of esters having remote chiral/prochiral centers. *J. Org. Chem.*, **55**, 6252-6259.

Hulse, J.H. (2004). Biotechnologies: past history, present state and future prospects. *Trends Food Sci. Technol.*, **15**, 3-18.

Ikeda, I., Klibanov, A.M. (1993). Lipase-catalyzed acylation of sugars in hydrophobic solvents by complexation. *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 788-791.

Ikeda, I., Sato, I., Suzuki, K. (1991). Synthesis of esters by lipase immobilized on poly(vinylalcohol)-poly(ethyleneimine) copolymers in organic solvents. *Sen'i Gakkaishi*, **47**, 198-202.

Ikushima, Y., Saito, N., Hatakeda, K., Sato, O. (1996). Promotion of lipase-catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide in the near-critical region. *Chem. Eng. Sci.*, **51**, 2817-2822.

Inada, Y., Matsushima, A., Takahashi, K., Saito, Y. (1990). Polyethylene glycol-modified lipase soluble and active in organic solvents. *Biocatalysis*, **3**, 317-328.

Iriuchijima, S., Kojima, N. (1982). Asymmetric hydrolysis of (±)-1,2-diacetoxi-3-chlorpropane and its related compounds with lipase. Synthesis of optically pure (*S*)-propranolol. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1153-1157.

Isobe, M., Sugiura, M. (1977). Studies on the lipase of *Chromobacterium viscosum*. V. Physical and chemical properties of the lipases. *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 1980-1986.

Itoh, T., Kuroda, K., Tomosada, M., Takagi, Y. (1991). Design of α-alkyl-β-hydroxy esters suitable for providing optical resolution by lipase hydrolysis. *J. Org. Chem.*, **56**, 797-804.

IUPAC/IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1972). Enzyme nomenclature, recommendations, în *Comprehensive Biochemistry* (editori Florkin, M., Stotz, E.H.), **Vol. 13**, Elsevier, Amsterdam.

Iwai, M., Tsujisaka, Y. (1974). The purification and the properties of three kinds of lipases from *Rhizopus delemar*. *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 1241-1247.

Jaeger, K.H., Reetz, M.T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends Biotechnol., 16, 396-403.

Jensen, R.G., Galuzzo, D.R., Bush, V.J. (1990). Selectivity is an important characteristic of lipases (acylglycerol hydrolases). *Biocatalysis*, **3**, 307-316.

Jin, W., Brennan, J.D. (2002). Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. *Anal. Chim. Acta*, **461**, 1-36.

Kalaritis, P., Regenye, R.W., Partridge, J.J., Coffen, D.L. (1990). Kinetic resolution of 2-substituted esters catalyzed by a lipase, ex. Pseudomonas fluorescens. *J. Org. Chem.* **55**, 812-815.

Kanerva L.T., Rakiala K., Vänttinen E. (1992). Lipase catalysis in the optical resolution of 2-amino-1-phenylethanol derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1*, **14**, 1759-1762

Kay, G., Crook, E. M. (1967). Coupling of enzymes to cellulose using chloro-s-triazines. *Nature (London)*, **216**, 514-515.

Kazlauskas, R.J. Bornscheuer, U.T. (1998). Biotransformations with lipases, în *Biotechnology*, Ediția a 2-a, **Vol. 8a**, *Biotransformations* (Editor Kelly, D.R.), Wiley-VCH, Weinheim, 38-191.

Kennedy, J.F.; Cabral, J.M.S. (1987). Enzyme immobilization, în *Biotechnology, A Comprehensive Treatise in 8 Volumes*, **Vol. 7a**: Enzyme Technology (editori Rehm, H.-J.; Reed, G.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 347-404.

Khan, S.A., Halling, P.J., Bell, G. (1990). Measurement and control of water activity with an aluminium oxide sensor in organic two-phase reaction mixtures for enzymic catalysis. *Enzyme Microb. Technol.* **12**, 453-458.

Khmelnitsky, Y.L., Belova, A.B., Levashov, A.V., Mozhaev, V.V. (1991). Relationship between surface hydrophilicity of a protein and its stabitlity against denaturation by organic solvents. *FEBS Lett.*, **284**, 267-269.

Khmelnitsky, Y.L., Levashov, A., Klyachko, N., Martinek, K. (1988). Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enz. Microb.Technol.*, **10**, 710-724.

Khmelnitsky, Y.L., Zharinova, I.N., Berezin, I.V., Levashov, A., Martinek, K. (1987). Detergentless microemulsions. A new microheterogeneous medium for enzymatic reaction. *Enzyme Engineering 8,* (editori Laskin, A.I., Mosbach, K., Thomas, D., Wingard, L.B.J.) New York Academy of Science, New York, 161-164.

Kierstan, M., Bucke, C. (1977). The immobilization of microbial cells, subcellular organelles, and enzymes in calcium alginate gels. *Biotechnol. Bioeng.* **19**, 387-397.

Kilara, A., Shahani, K.M. (1979). The use of immobilized enzymes in the food industry: a review. *CRC Crit. Rew. Food Sci. Nutr.*, 161-198.

Kimura, Y., Tanaka, A., Sonomoto, K., Nihira, T., Fukui, S. (1983). Application of immobilized lipase to hydrolysis of triacylglyceride. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 107-112.

Kirchner, G., Scollar, M.P., Klibanov, A.M. (1985). Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.,* **107**, 7072-7076.

Klempier, N., Faber, K., Griengl, H. (1989). Biocatalytic preparation of enantiomerically pure *endo*-bicyclo[3.2.0]oct-7-en-2-ol. *Synthesis,* **12**, 933-934.

Klibanov, A.M. (1990). Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Acc. Chem. Res.,* **23**, 114-120.

Klibanov, A.M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, **409**, 241-246.

Kokusho, Y., Machida, H., Iwasaki S. (1982). Production and properties of alkaline lipase from *Alcaligenes* sp. strain No. 679. *Agr. Biol. Chem.*, **46**, 1159-1164.

Kosaric, N., Zajic, J.E., Aboue, G., Jack, T., Gerson, D. (1979). Lipase synthesis in hydrocarbon fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1133-1149.

Kosugi, Y., Suzuki, H. (1983). New paramteres for simulating progress curves of the lipase reaction. *J. Ferment. Technol.*, **61**, 287-294.

Kosugi, Y., Suzuki, H. (1992). Functional immobilization of lipase eliminating lipolysis product inhibition. *Biotechnol.Bioeng.*, **40**, 369-374.

Kosugi, Y., Suzuki, H., Funada, T. (1988). Hydrolysis of beef tallow by lipase from *Pseudomonas* sp. *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 349-356.

Kuhl, P., Halling, P.J. (1991). Salt hydrates buffer water activity during chymotrypsin catalysed peptide synthesis . *Biochim. Biophys. Acta,* **1078**, 326-328.

Kvittingen, L., Sjursnes, B., Anthonsen, T., Halling, P.J. (1992). Use of salt hydrates to buffer optimal water level during lipase catalysed synthesis in organic media: a practical procedure for organic chemists. *Tetrahedron,* **48**, 2793-2802.

Kvittingen, L., Sjursnes, B., Anthonsen, T., Halling, P.J. (1992). Salt hydrates to buffer optimal water level during lipase catalysed synthesis in organic media: a practical procedure for organic chemists. *Tetrahedron*, **48**, 2793-2802.

Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. (1987). Optimization of biocatalysis in organic media, în *Biocatalysis in organic media* (editori Laane, C., Tramper, J., Lilly, M.D.), Elsevier, Amsterdam, 65-84.

Laane, C., Tramper, J., Lilly, M.D. (editori) (1987). *Biocatalysis in Organic Media*, Elsevier, Amsterdam.

Ladner, W.E., Whitesides, G.M. (1984). Lipase catalyzed hydrolysis as a route to esters of chiral epoxy alcohols. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7250-7251.

Lagocki, J.W., Law, J.H., Kézdy, F.J. (1973). The kinetic study of enzyme action on substrate monolayers. *J.Biol.Chem.*, **248**, 580-587.

Lamare, S., Legoy, M.D. (1993). Biocatalysis in the gas phase. *Trends Biotechnol.*, **11**, 413-418.

Langrand, G., Baratti, J., Buono, G., Triantaphylides, C. (1988). Enzymatic separation and resolution of nucleophiles: a predictive kinetic model. *Biocatalysis*, **1**, 231-248.

Langrand, G., Rondot, N., Triantaphylides, C., Baratti, J. (1990). Short chain flavor esters synthesis by microbial lipases. *Biotechnol. Lett.*, **12**, 581-586.

Langrand, G., Triantaphylides, C., Baratti, J. (1988). Lipase catalyzed formation of flavour esters. *Biotechnol. Lett.*, **10**, 549-554.

Lazar, G. (1985). Estersynthesen mit lipasen. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **87**, 394-400.

Lee, K.-T., Akoh, K.K. (1998). Immobilization of lipase on clay, Celite 545, diethylaminoethyl- and carboxymethyl-Sephadex and their interesterification activities, *Biotechnol. Tech.*, **12**, 381-384

Lee, S.Y., Lee, B.H. (1989). Production and characterization of esterase-lipase of *Lactobacillus casei* subsp. *Pseudoplantarum* LE2. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **11**, 552-563.

Linko, Y.Y., Rantanen, O., Yu, H.C., Linko P. (1992) în *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (editor Tramper J. ş.a.), *Progress in Biotechnology*, **Vol. 8**, Elsevier, Amsterdam.

Liu, W.R., Langer, R.L., Klibanov, A.M. (1991). Moisture-induced aggregation of lyophilized proteins in the solid state. *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 177-184.

Liu-Osheroff, P., Guillory, R.J. (1972).The enzymic properties of a modified ox heart myosin adenosine triphosphatase on covalent binding to an insoluble cellulose matrix. *Biochem. J,*. **127**, 419-424.

Lortie, R., Trani, M., Ergan, F. (1992). Lipase catalyzed triglyceride synthesis. The role of isomerization, în *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (editor Tramper J. ş.a.), *Progress in Biotechnology*, **Vol. 8**, , Elsevier, Amsterdam, 519-524.

Louvrier, A., Drtina, G.J., Klibanov, A.M. (1996). On the issue of interfacial activation of lipase in nonaqueous media. *Biotechnol. Bioeng.* **50**, 1-5.

Luisi, P.L., Laane, C. (1986). Solubilization of enzymes in apolar solvents via reverse micelles. *Trends Biotechnol.*, **4**, 153-161.

Macrae, A.R. (1983). Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **60**, 291-294.

Macrae, A.R. (1989). Tailored triacylglycerols and esters. *Biochem. Soc. Trans.* **17**, 1146-1148.

Maeda, H., Yamauchi, A., Suzuki, H. (1973). Preparation of immobilized enzymes by gamma-ray irradiation. *Biochim. Biophys. Acta*, **315**, 18-21.

Malcata, F.X., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, C.G., Amudson, C.H. (1992). Kinetics and mechanism of reactions catalysed by immobilised lipases. *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 426-446.

Margolin, A.L., Crenne, J.Y., Klibanov, A.M. (1987). Stereoselective oligomerization catalyzed by lipases in organic solvents. *Tetrahedron Lett.*, **28**, 1607-1610.

Marty, A., Chulalaksananukul, W., Willemot, R.M., Condoret, J.S. (1992). Kinetics of lipase-catalyzed esterification in supercritical CO_2. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 273-280.

May, S.W. (1992). Biocatalysis in the 1990s: a perspective. *Enzyme Microb.Technol.* **14**, 80-84.

Maylie, M.L., Charles, F., Sarda, L., Desnuelle, P. (1969). Action of organophosphates on pancreatic lipase. *Biochim. Biophys. Acta,* **178**, 196-198.

McNeill, G.P., Shimizu, S., Yamane, T. (1990). Solid phase enzymatic glycerolysis of beef tallow resulting in a high yield of monoglyceride. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**, 779-783.

McNeill, G.P., Shimizu, S., Yamane, T. (1991). High-yield enzymatic glycerolysis of fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 1-5.

McNeill, G.P., Yamane, T. (1991). Further improvements in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 6-10.

Michaelis, L., Menten, M.L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.*, **49**, 333-369.

Miller, D.A., Prausnits, J.M., Blanch, H.W (1991). Kinetics of lipase-catalysed interesterification of triglycerides in cyclohexane. *Enzyme Microb.Technol.*, **13**, 98-103.

Mitz, M. A. (1956). New insoluble active derivative of an enzyme as a model for study of cellular metabolism. *Science* **123**, 1076-1077.

Miyazawa, T., Takitani, T., Ueji, S., Yamada, T., Kuwata, S. (1988). Optical resolution of unusual amino-acids by lipase-catalyzed hydrolysis. *J. Chem. Soc. Chem.Commun.* 1214-1215.

Momsen, W.E., Brockman, H.L. (1976). The adsorbtion and hydrolysis of a 1,3-didecanoil glycerol monolayers by pancreatic lipase. *J. Biol. Chem.*, **248**, 580-587.

Mori, T., Tosa, T., Chibata I. (1973). Enzymatic properties of microcapsules containing asparaginase.Biochim. Biophys. Acta., 321, 653-661.

Morita, S., Narita, H., Matoba, T., Kito, M. (1984). Synthesis of triacylglycerol by lipase in phosphatidylcoline reverse micellar system. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 1571-1574.

Morrow, C.J., Wallace, J.S. (1990). Synthesis of polyesters by lipase-catalyzed polycondensation in organic media, în *Biocatalysis* (editor Abramowicz, D.), Van Nostrand Reinhold, New York, 25-62.

Moskowitz, G.J., Cassaigne, R., West, I.R., Shen, T., Feldman, L.I. (1977). Hydrolysis of animal fat and vegetable oil with Mucor miehei esterase. Properties of the enzyme. *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 1146-1150.

Mukataka, S., Kobayashi, T., Takahashi, J. (1985). Kinetics of enzymatic hydrolysis of lipids in biphasic organic-aqueous systems. *J. Ferment. Technol.*, **63**, 461-466.

Mukherjee, K.D. (1990). Lipase-catalyzed reactions for modification of fats and other lipids. *Biocatalysis*, **3**, 277-293.

Mukherjee, K.D., Kiewitt, I. (1991). Enrichment of γ-linolenic acid from fungal oil by lipase-catalysed reactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 579-584.

Mukherjee, K.H. (1995). Fractionation of fatty acids and other lipids via lipase-catalyzed reactions. *Ol. Corps Gras Lipides* **2**, 365-368.

Müller G. (1984). Das Pankreaslipase/Colipase-System. *Z. ges. inn. Med.*, **39**, 321-325.

Müller K.P. (1977). Verfahren zur Herstellung eines lipasereichen Enzympräparates. *Brevet german* DE 2.716.719.

Muraoka, T., Ando, T., Okuda, H. (1982). Purification and properties of a novel lipase from *Staphylococcus aureus* 226. *J.Biochem.*, **92**, 1933-1939.

Nagao, A., Kito, M. (1990). Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid esters useful in the food industry. *Biocatalysis*, **3**, 295-305.

Nakashima, T., Fukuda, H., Nojima, Y., Nagai, S. (1989). Intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* using biomass support particles in a circulating bed fermentor. *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 19-24.

Nelson, J.M., Griffin, E.G. (1916). Adsorption of invertase. *J.Am.Chem.Soc.*, **38**, 1109-1115.

Nielsen, P.H., Malmos, H., Damhus, T., Diderichsen, B., Nielsen, H.K., Simonsen. M., Schiff, H.E., Oestergaard, A., Olsen, H.E., Eigtved, P., Nielsen, T.K. (1994). Enzyme applications: Industrial, în *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (editor Grant, M.H.), Ediția a 4-a, **Vol. 9** , Wiley-Interscience, New-York, 567-620.

Nielsen, T. (1985). Industrial application possibilities for lipases. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **87**, 15-19.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) (1999). Enzyme Supplement 5. *Eur. J. Biochem.*, **264**, 610-650.

Noritomi, H., Almarsson, Ö., Barletta, G.L., Klibanov, A.M. (1996). The influence of the mode of enzyme preparation on enzymatic enantioselectivity in organic solvents and its temperature dependence. *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 95-99.

O'Driscoll, K.F. (1976). *Methods Enzymol.*, **44**, 169-183.

Oguntimein, G.B., Erdmann, H., Schmidt, R.D. (1993). Lipase catalysed synthesis of sugar ester in organic solvents. *Biotechnol. Lett.*, **15**, 175-180.

Okumura, S., Iwai, M., Tsujisaka, S. (1976). Positional specificities of four kinds of microbial lipases. *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 665-660.

Okumura, S., Iwai, M., Tsujisaka, Y. (1979). Synthesis of various kinds of esters by four microbial lipases. *Biochim. Biophys. Acta,* **575**, 156-165.

Okumura, S., Iwai, M., Tsujisaka, Y. (1980). Purification and properties of a partial glyceride hydrolase of *Penicillium cyclopium* M1. *J. Biochem.*, **87**, 205-211.

O'Neill, S.P., Dunnill, P., Lilly, M.D. (1971). A comparative study of immobilized amyloglucosidase in a packed bed reactor and a continuous feed stirred tank reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 337-352.

Orrenius, C., Ohrner, N., Rotticci, D., Matison, A., Hult, K., Norin, T. (1995). *Candida antarctica* lipase B catalyzed kinetic resolutions: substrate structure requirements for the preparation of enantiomerically enriched secondary alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry.*, **6**, 1217-1220.

Ota, Y., Gomi, K., Kato, S., Sugiura, T., Minoda, Y. (1982). Purification and some properties of cell-bound lipase from *Saccharomycopsis lipolytica. Agr. Biol. Chem.* **46**, 2885-2993.

Oxford University Press, Oxford (U.K.).

Pal, N., Das, S., Kundu, A.K. (1978). Influence of culture and nutritional conditions on the production of lipase by submergent culture of *Aspergillus niger. J. Ferment. Technol.*, **56**, 593-598.

Palmer, D.C., Terradas, F. (1994). Regioselective enzymatic deacylation of sucrose octaacetate in organic solvents. *Tetrahedron Lett.* **35**,1673-1676.

Pandey, A., Sailas, B., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V.T. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **29**, 119-131.

Papendorf, O., Steffen, B., Lang, S., Wagner, F. (1995). Monoacyl glycerols: bio(chemical) production and interfacial properties. *Chimica Oggi/Chemistry Today*, **13**(10), 17-20.

Payen, A., Persoz, J.F. (1833). Mémoire sur la diastase, les principaux produits de ses réactions, et leurs applications aux arts industriels. *Ann. Chim. (Phys.),* **53**, 73-92.

Peter, F. (1999). *Teză de doctorat*, Universitatea Politehnica, Timişoara.

Peter, F., Anghel, A., Bota, M. (1995). Lipase biosynthesis by an *Aspergillus niger* strain. *Chem.Bull.Tech.Univ.(Timişoara),* **40**, 49-56.

Peter, F., Preda, G. (2002). Characterisation of pancreatic lipase substrate specificity by a kinetic method. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **19-20C**, 467-472.

Petri, A., Gambicorti, T., Salvadori, P. (2004). Covalent immobilization of chloroperoxidase on silica gel and properties of the immobilized biocatalyst. *J.Mol.Catal. B: Enzymatic*, **27**, 103-106.

Pierre, A.C. (2004). The sol-gel encapsulation of enzymes. *Biocat. Biotrans.*, **22**, 145-170.

Pina, M., Graille, J. (1983). Synthèse enzymatique de glicérides partiels a partir de glycérol et d'acides gras. *Gattefosse Report* **76**, 34-36.

Piszkiewicz, D. (1977). *Kinetics of Chemical and Enzyme-Catalyzed Reactions,*

Plou, F.J., Baradiaran, M., Calvo, M.V., Ballesteros, A., Pastor, R. (1996). High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein *Enzyme Microb.Technol.*, **18**, 66-71.

Poppe, L., Novák, L. (1992). *Selective biocatalysis*, Wiley-VCH, Weinheim.

Preda, G., Peter, F., Dragomirescu, M. (2003). *Biocatalizatori enzimatici. Obținere, caracterizare, aplicații*, Ed. Mirton, Timişoara.

Prenosil, J.E., Kut, Ö.M., Dunn, I.J., Heinzle, E. (1989). Immobilized biocatalysts, în *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Ediția a 5-a, **Vol. A14**, Wiley-VCH, Weinheim, 1-48.

Rangheard, M.S., Langrand, G., Triantaphylides, C., Baratti, J. (1989). Multi-competitive enzymatic reactions in organic media: a simple test for the determination of lipase fatty acid specificity. *Biochim. Biophys. Acta,* **1004**, 20-28.

Rangheard, M.S., Langrand, G., Triantaphylides, C., Baratti, J. (1992). Multi-competititve enzyme reactions in organic media: application to the determination of lipase alcohol specificity. *Enzyme Microb.Technol.*, **14**, 966-973.

Ratledge, C. (1989). Biotechnology as applied to the oils and fats industry. *Biochem Soc.Trans.*, **17**, 1139-1141.

Reetz, M.T. (1997). Entrapment of biocatalysts in hydrophobic sol-gel materials for use in organic chemistry. *Adv. Mat.*, **9**, 943-954.

Reetz, M.T., Tielmann, P., Wiesenhöfer, W., Könen, W, Zonta, A. (2003). Second generation sol-gel encapsulated lipases: robust heterogeneous biocatalysts. *Adv. Synth. Catal.*, **345**, 717-728.

Reetz, M.T., Zonta, A. and Simpelkamp, J. (1996) Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. *Biotechnol. Bioeng.* **49**, 527-534.

Rekker, R.F. (1977). *The hydrophobic fragmental constants,* Elsevier, Amsterdam.

Rhône-Poulenc Ind. (1979). Procédé de préparation du chloro-3-methyl-2-propanol lévogyre par hydrolyse enzymatique. *Brevet francez,* FR 2.454.465.

Rivera Munoz, G., Tinoco-Valencia, J.R., Sanchez, S., Farrés, A. (1991). Production of microbial lipases in a solid state fermentation system. *Biotechnol. Lett.*, **13**, 227-280.

Roberts, D.V. (1977). *Enzyme Kinetics,* Cambridge University Press, Cambridge.

Roşu, R., Uozaki, Y., Iwasaki, Y., Yamane, T. (1997). Repeated use of immobilized lipase for monoacylglycerol production by solid-phase glycerolysis of olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.,* **74**, 445-450.

Roşu, R., Uozaki, Y., Iwasaki, Y., Yamane., T. (1997). Repeated use of immobilized lipase for monoacylglycerol production by solid phase glycerolysis of olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**, 445–450.

Rotticci, D., Orrenius, C., Hult, K., Norin, T. (1997) Enantiomerically enriched bifunctional *sec*-alcohols prepared by *Candida antartica* lipase B catalysis. Evidence of non-steric interactions. *Tetrahedron: Asymmetry*, **8**, 359-362.

Rubio, E., Fernandez-Mayorales, A., Klibanov, A.M. (1991). Effect of the solvent on enzyme regioselectivity. *J. Am.Chem. Soc.*, **113**, 695-696.

Sarda, L., Desnuelle, P. (1958). Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 513-521.

Sarney, D.B., Fregrapane, G., Vulfson, E.N. (1994). Lipase-catalyzed synthesis of lysophospholipids in a continuous bioreactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71**, 93-96.

Sarney, D.B., Kapeller, H., Fregrapane, G., Vulfson, E.N. (1994). Chemo-enzymatic synthesis of disaccharide fatty acid esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**, 711-714.

Sato, T., Nishida, Y., Tosa, T., Chibata, I. (1979). Immobilization of *Escherichia coli* cells containing aspartase activity with κ-carrageenan. Enzymic properties and application for L-aspartic acid production. *Biochim. Biophys. Acta*, **570**, 179-186.

Schmid, R.D., Verger, R. (1998). Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**, 1608-1633.

Schneider, M.P. (1995) în: *Biocatalysis in Organic Synthesis*, Milano, 13-17 martie1995 (comunicare).

Schoffers, E., Golebiowski, A., Johnson, C.R. (1996). Tetrahedron report number 392. Enantioselective synthesis through enzymatic asymmetrization. *Tetrahedron*, **52**, 3769-3826.

Semeriva, M., Desnuelle, P. (1979). Pancreatic lipase and colipase. An example of heterogeneous biocatalysis. *Adv. Enzymol. Relat Areas Molec. Biol.*, **48**, 319-370.

Semeriva, M., Dufour, C., Desnuelle, P. (1971). On the probable involvment of an histidine residue in the active site of pancreatic lipase. *Biochemistry*, **10**, 2143-2149.

Shahani, K.M. (1975). Lipases and esterases, în Enzymes in Food Processing (editor Reed, G.R.), Ediția a 2-a., Academic Press, New York, 1975, 181-217.

Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.*, **19**, 627-662.

Shaw, J.F., Chang, C.H., Wang, Y.J. (1989). Characterization of three distinct forms of lipolytic enzyme in a commercial *Candida* lipase preparation. *Biotechnol.Lett.*, **11**, 779-784.

Sheldon, R.A. (1993). *Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds*, Marcel Dekker, New York.

Shimada, Y., Sugihara, A., Iizumi, T., Tominaga, Y. (1990). cDNA cloning and characterization of *Geothricum candidum* lipase II. *J. Biochem.*, **107**, 703-707.

Sjursnes, B., Kvittingen, L., Antonsen, T., Halling, P.J. (1992). Control of water activity by using salt hydrates in enzyme catalysed esterifications in organic media, în *Biocatalysis in Non-Conventional Media (Progress in Biotechnology, Vol. 8)*, (editor Tramper J. ș.a.), Elsevier, Amsterdam, 451-457.

Soares, C.M.F., M. Santana, M.H.A., Gisella M. Zanin, G.M., de Castro, H.F. (2003). Covalent Coupling method for lipase immobilization on controlled pore silica in the presence of nonenzymatic proteins. *Biotechnol. Prog.*, **19**, 803-807.

Solomon, B, Levin, Y (1974). Studies on the binding of amyloglucosidase to inert proteins. *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 1393-1398.

Sonnet, P.E. (1988). Lipase selectivities. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, 900-904.

Soumillion, P., Fastrez, J. (2001). Novel concepts for selection of catalytic activity. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**, 387-394.

Stamatis, H., Xenakis, A., Provelengiou, M., Kolisis, F.N. (1993). Esterification reactions catalyzed by lipases in microemulsions: the role of enzyme localization in relation to its selectivity. *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 103-110.

Stanbury, P.F., Whitaker, A. (1985). *Principles of fermentation technology*, Pergamon Press, Oxford.

Stevenson, D.E., Storer, A.C. (1991). Papain in organic solvents: determination of conditions suitable for biocatalysis and the effect on substrate specificity and inhibition. *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 519-527.

Sugihara, A., Schimada, Y., Tominaga, Y. (1990). Separation and characterization of two molecular forms of *Geothricum candidum* lipase. *J. Biochem.*, **107**, 426-430.

Sugiura, M., Isobe, M. (1975). Studies on the mechanism of lipase reaction. I. Inhibition of lipase activity by emulsion of organic solvents. *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 1226-1230.

Sugiura, M., Oikawa, T., Hirano, K., Inukai, T. (1977). Purification, crystallization and properties of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas fluorescens*. *Biochim. Biophys. Acta*, **488**, 353-358.

Sumner, J. B. (1926). The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease: Preliminary Paper. *J. Biol.Chem.*, **69**, 435-441.

Svendsen, A. (2000). Lipase protein engineering. *Biochim. Biophys. Acta*, **1543**, 223-238.

Svensson, I., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1990). Interesterification of phosphatidylcholine with lipases in organic media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 255-258.

Svensson, I., Wehtje, E., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1994) Effects of water activity on reaction rates and equilibrium positions in enzymatic esterification. *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 549-556.

Sztajer, H., Maliszewska, I. (1984). The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. *Biotechnol.Lett.*, **11**, 895-898.

Tawaki, S., Klibanov, A.M. (1993). Chemoselectivity of enzymes in anhydrous media is strongly solvent – dependent. *Biocatalysis*, **8**, 3-19.

Taylor, F., Kurantz, M.J., Craig, J.C. (1992). Kinetics of continuous hydrolysis of tallow in multi-layered flat-plate immobilized lipase reactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 591-594.

Therisod, M., Klibanov, A.M. (1986). Facile enzymatic preparation of monoacylated sugars in pyridine. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 5638-5640.

Therisod, M., Klibanov, A.M. (1987). Regioselective acylation of secondary hydroxyl groups in sugars catalyzed by lipases in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3977-3981.

Tosa, T.; Sato, T.; Mori, T.; Yamamoto, K.; Takata, I.; Nishida, Y.; Chibata, I. (1979). Immobilization of enzymes and microbial cells using carrageenan as matrix. *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1697-1709.

Towey, T.F., Rees, G.D., Steytler, D.C., Price, A.L., Robinson, B.H. (1994). Winsor-II microemulsion systems in bioseparations-a model reaction for extractive bioconversions. *Bioseparation*, **4**, 139-147.

Tramper, J., van der Plas, H.C., Linko, P. (editori) (1985). *Biocatalysis in Organic Synthesis*, Elsevier, Amsterdam.

Tramper, J., Vermue, M.H., Beeftink, H.H., von Stockar, U. (editori) (1992). *Biocatalysis in Non-Conventional Media (Progress in Biotechnology, Vol. 8)*, Elsevier, Amsterdam.

Triantafyllou, A.Ö., Wang, D., Wehtje, E., Adlercreutz, P. (1997). Polyacrylamides as immobilization supports for use of hydrolytic enzymes in organic media. *Biocat. Biotrans.*, **15**, 185-193.

Tsujisaka, S., Okumura, S., Iwai, M. (1977). Glyceride synthesis by four kinds of microbial lipase. *Biochim. Biophys. Acta*, **489**, 415-422.

Tsujisaka, Y., Iwai, M., Tominaga, Y. (1973). Purification, crystallization and some properties of lipase from *Geothricum candidum* link. *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1457-1464.

Tsuzuki, W., Okahata, Y., Katayama, O., Suzuki, T. (1991). Preparation of organic-soluble enzyme (lipase B) and characterization by gel permeation chromatography. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1245-1247.

Twu, J.S., Garfinkel, A.S., Schotz, M.C. (1984). Hepatic lipase. Purification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, **792**, 330-337.

Tyski, S., Hryniewicz, W., Jeljaszewicz, J. (1983). Purification and some properties of the staphylococcal extracellular lipase. *Biochim.Biophys.Acta* **749**, 312-317.

Uzawa, H., Nishida, Y., Ohrui, H., Meguro, H. (1990). A new approach to determine the stereospecificity in lipase catalysed hydrolysis using circular dichroism: lipases produce optically active diglycerides from achiral triglycerides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **168**, 506-511.

Uzawa, H., Ohrui, H., Meguro, H., Mase, T., Ichida, A. (1993). A convenient evaluation of the stereoselectivity of lipase-catalyzed hydrolysis of tri-O acylglycerols on a chiral-phase liquid chromatography. *Biochim. Biophys. Acta*, **1169**, 165-168.

Valivety, R.H., Halling, P.J., Macrae, A.R. (1992). Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents. *Biochim. Biophys. Acta*, **1118**, 218-222.

Valivety, R.H., Halling, P.J., Macrae, A.R. (1992). *Rhizomucor miehei* lipase remains highly active at water activity below 0.0001. *FEBS Letters* **301**, 258-260.

Valivety, R.H., Halling, P.J., Peilow, A.D., Macrae, A.R. (1992). Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity *Biochim. Biophys. Acta*, **1122**, 143-146.

Verger R. (1980). Enzyme kinetics of lipolysis, *Methods Enzymol.*, **64**, 340-392.

Verger, R. (1984). Pancreatic lipases, în *Lipases* (editor Borgstroem, B.), Elsevier, Amsterdam, 84-148.

Verger, R., De Haas, G.H., Sarda, L., Desnuelle, P. (1969). Purification from porcine pancreas of two molecular species with lipase activity. *Biochim. Biophys. Acta,* **188**, 272-282.

Vulfson, E.N. (1991). Enzymatic synthesis of surfactants, în *Surfactants in Lipid Chemistry: Recent Synthetic, Physical, and Biodegradative Studies* (editor Tyman, J.H.P.), Royal Society of Chemistry, London, 16-37.

Weber, N., Mukherjee, K.D. (2004). Solvent-free lipase-catalysed preparation of diacylglycerols. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5347-5353.

Weliky, N., Brown, F.S., Dale, E.C. (1969). Carrier-bound proteins: Properties of peroxidase bound to insoluble carboxymethylcellulose. *Arch. Biochem. Biophys.*, **131**, 1-8.

Werdelmann, B.W., Schmid, R.D. (1982). The biotechnology of fats–a challenge and an opportunity. *Fette, Seifen, Anstrichmittel,* **84**, 436-443.

Winkler, F.K., D'Arcy, A., Hunziker, W. (1990). Structure of human pancreatic lipase, *Nature*, **343**, 771-774.

Wong, S.S., Wong, L.-J.C. (1992). Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme. Microb. Technol.*, **14**, 866-874.

Woodward, J. (1985). Immobilised enzymes: adsorbtion and covalent coupling, în *Immobilised cells and enzymes. A practical approach* (editor Woodward, J.), IRL Press, Oxford.

Worsfold, P.J. (1995). Classification and chemical characteristics of immobilized enzymes. *Pure & Appl. Chem.*, **67**, 597-600.

Worthington Co. (1975). *The Worthington Manual*, 212-215.

Woundenberg-van Oosterom, M., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A. (1996). The regioselectivity of the lipase-catalyzed acylation of 1,6-anhydro-β-D-glycopyranoses. *Biotechnol.Bioeng.*, **49**, 328-33.

Wu, H.S., Akoh, C.C., Phillips, R.S. (1996). Lipase-catalyzed stereoselective esterification of D,L-menthol in organic solvents using acid anhydrides as acylating agents. *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 536-539.

Wu, S.H., Guo, Z.W., Sih, C.J. (1990). Enhancing the enantioselectivity of *Candida* lipase catalyzed ester hydrolysis via noncovalent enzyme modification. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 1990-1995.

Yamane, T. (1987). Enzyme technology for the lipids industry: an engineering overview. *J. Am. Oil Chem. Soc,* **64**, 1657-1662.

Yamane, T., Hoq, M.M., Shimizu, S., Ishida, S., Funada, T. (1984). Continuous synthesis of glycerides by lipase in a microporous membrane bioreactor. *Ann. NY Acad Sci. (Enzyme Engineering 7),* **434**, 558-568.

Yang, D., Rhee, J.S. (1992). Continuous hydrolysis of olive oil by immobilized lipase in organic solvent. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 748-752.

Yang, Z., Russell, A.J. (1996). Fundamentals of non-aqueous enzymology, în *Enzymatic reactions in organic media* (editori Koskinen, A.M.P., Klibanov, A.M.). Chapman&Hall, London, 43-69.

Zaks, A. (1996). New enzimatic properties in organic media, în *Enzymatic reactions in organic media* (editori Koskinen, A.M.P., Klibanov, A.M.), Chapman&Hall, London, 70-93.

Zaks, A., Klibanov, A.M. (1984). Enzymatic catalysis in organic media at 100°C, *Science,* **224**, 1249-1251.

Zaks, A., Klibanov, A.M. (1984). Enzymatic catalysis in organic media at 100° C. *Science,* **224**, 1249-1251.

Zaks, A., Klibanov, A.M. (1985). Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **82**, 3192-3196.

Zaks, A., Klibanov, A.M. (1986). Substrate specificity of enzymes in organic solvents vs. water is reversed. *J. Am.Chem. Soc.,* **108**, 2767-2768.

Zaks, A., Klibanov, A.M. (1988). Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.,* **263**, 3194-3201.

Zarevucka, M., Rejzek, M., Streinz, L., Saman, D., Wimmer, Z. (1995). Lipase-mediated hydrolysis and esterification: Part II, în *Bioflavour '95*, Ed. INRA Paris (Les Colloques no.75), 345-349.

Zubenko, T.F., Sultanova, I.G., Zakirov, M.Z. (1978). The effect of various nitrogen sources on lipase production by *Rhizopus microsporus*. *Mikrobiologiya,* **47**, 672-674. Campbell, M. (1995). *Biochemistry*, ediția a 2-a, Saunders College Publishing, Philadelphia.

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B.C.U. "M. EMINESCU" IAŞI

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

EDITURA POLITEHNICA

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ISBN: 973-625-212-4